

میزان شیوع لیشمانیوز پوستی در دانش آموزان شهر بم و بروات در بهار ۱۳۸۵

دکتر محمدرضا افلاطونیان^{۱*}، دکتر ابرج شریفی^۲

خلاصه

مقدمه: لیشمانیوز پوستی یکی از معضلات کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری از جمله ایران است. شهر بم یکی از کانون‌های بسیار قدیمی لیشمانیوز شهری است و زلزله پنجم دیماه سال ۱۳۸۲ تغییرات جمعیتی و زیست محیطی قابل توجهی در چهره اپیدمیولوژیک بیماری ایجاد نمود. این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع لیشمانیوز پوستی در دانش آموزان و درمان بیماران انجام شد تا بتوان با استفاده از نتایج آن برنامه‌های پیشگیری و کنترل مناسبی مطابق با شرایط موجود در شهرستان زلزله زده بم تدوین نمود.

روش: در این بررسی ۴۹۳۱ نفر دانش آموز به صورت مقطعی از ۳۰ مدرسه دخترانه و پسرانه در مقاطع تحصیلی دبستان، راهنمایی و دبیرستان طی بهار ۱۳۸۵ به صورت تصادفی انتخاب و مورد معاینه قرار گرفتند. افراد مظنون به لیشمانیوز پوستی به مرکز پیشگیری و کنترل سالک در شهر بم ارجاع داده شدند. پس از نمونه‌گیری و آزمایش مستقیم دانش آموزان مبتلا تحت درمان قرار گرفتند و برای آنها پرسش‌نامه‌ای حاوی سؤالات دموگرافیک و پزشکی تکمیل گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون کای دو انجام شد.

یافته‌ها: میزان شیوع زخم فعال در بین دانش آموزان ۴/۹٪ بود که پسرها با میزان شیوع ۶/۳٪ و دخترها با میزان شیوع ۳/۶٪ اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0/001$). نسبت ضایعات لوپوئیدی در دانش آموزان پسر (۸۰/۹٪) به مراتب بیشتر از دخترها (۱۹/۱٪) ($P < 0/005$) و میزان شیوع اسکار در کل دانش آموزان ۱۴/۹٪ بود که دانش آموزان راهنمایی به‌طور معنی‌داری با مقطع دبستان و دبیرستان اختلاف داشتند ($P < 0/05$). در مجموع ۷۴/۵٪ یک زخم، ۱۷/۳٪ دو زخم و ۸/۲٪ سه زخم و بیشتر داشتند. زخم‌ها به میزان ۴۷/۸٪ روی دست، ۳۳/۸٪ روی صورت، ۱۴/۹٪ روی پا و ۳/۵٪ در سایر نقاط بدن مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که نسبت به سال‌های قبل تغییراتی در سیمای اپیدمیولوژی بیماری ایجاد شده است که موارد مهم آن شامل افزایش کلی موارد بیماری و میزان شیوع بیشتر در پسرها نسبت به دخترها، بیشتر بودن فرم لوپوئید در پسرها نسبت به دخترها می‌باشند. هم‌چنین تفاوت‌هایی در تعداد و محل زخم و چهره بالینی بیماری دیده می‌شود. این مسأله ضرورت انجام تحقیقات بیشتر بر جنبه‌های اپیدمیولوژیک بیماری به ویژه انگل، میزبان و مخازن تصادفی احتمالی را برای دستیابی به شیوه مناسبی جهت کنترل، مورد تأکید قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، میزان شیوع، دانش آموزان بم و بروات

۱- مربی مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد گروه انگل شناسی و مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* نویسنده مسؤول: دفتر HSR و پایگاه تحقیقات جمعیت، معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: mraflatoonian@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۲۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۱/۲۷ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۱۹

مقدمه

لیشمانیوز بیماری ناشی از انگل لیشمانیا است که نوعی تک یاخته داخل سلولی می‌باشد. این انگل توسط نیش پشه خاکی به انسان انتقال می‌یابد و سبب اشکال بالینی مختلفی به صورت جلدی، مخاطی و یا احشایی می‌گردد (۲۱). این بیماری به دو نوع دنیای جدید و قدیم تقسیم می‌گردد که نوع دنیای قدیم در نواحی گرمسیری به ویژه در ایران و عراق از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار می‌باشد (۳۱). لیشمانیوز پوستی به دو فرم اپیدمیولوژیکی در کشورمان دیده می‌شود:

۱- نوع شهری که مخزن آن انسان و ناقل آن فلپوتوموس سرزنتی می‌باشد و در شهرهای تهران، شیراز، کرمان، بم، مشهد، نیشابور و سبزوار وجود داشته (۲،۳،۸،۱۲،۱۸،۲۴) و اخیراً هم از کانون‌های جدید رفسنجان و خمینی‌شهر اصفهان گزارش شده است (۶،۸).

۲- نوع روستایی که مخزن آن موش صحرائی و ناقل آن فلپوتوموس پاپاتاسی می‌باشد. در برخی مناطق شهرهای نطنز، اصفهان، سرخس، کاشان، لطف‌آباد، کاشمر، خوزستان و بافت وجود داشته (۷،۱۷،۱۹) و اخیراً هم از کانون‌های جدیدی از جمله خرامه شیراز و روستاهای اطراف کاشان گزارش گردیده است (۸،۱۰). لیشمانیوز پوستی از جمله بیماری‌هایی است که عوامل زیست محیطی، مهاجرت، شهرسازی بی‌رویه و بلاهای طبیعی و دست‌ساز بشر بر روند اپیدمیولوژیکی آن اثرات قابل ملاحظه‌ای دارد (۱،۱۲). در یک بررسی نشان داده شده است که ۱۶/۹٪ از سربازانی که به منطقه گویانای فرانسه در یک دوره چهار ماهه سفر کرده بودند به لیشمانیوز پوستی مبتلا شده‌اند (۱۵). در سال ۲۰۰۲ در مطالعه شهر باخیر ترکیه که سابقه لیشمانیوز جلدی در آن وجود داشته است موارد جدید بیماران که فاقد هرگونه زخم پوستی بوده‌اند، گزارش شده است (۱۴). شهر بم و بروت قبل از زلزله پنجم دیماه ۱۳۸۲ با جمعیتی معادل

۱۰۸۴۱۸ نفر (۷) یکی از کانون‌های قدیمی لیشمانیوز پوستی از نوع شهری (خشک) بود (۲۶). در مطالعه سال ۱۳۷۰ افلاطونیان و همکاران میزان شیوع زخم حاد در جمعیت شهر بم را ۳/۶٪ و میزان اسکار را ۲۶/۹٪ نشان دادند. در این مطالعه مشخص گردید که سالک از نوع شهری و مخزن آن صرفاً انسان می‌باشد (۳،۱۸).

در مطالعه‌ای که توسط ندیم و همکاران در سال ۱۳۷۴ انجام شد نشان داده شد که ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی در بم فلپوتوموس سرزنتی است که طی ۹ ماه در سال دارای دو پیک فعالیت می‌باشد (۲۰). در مطالعه دیگری که توسط آقاسی و شریفی در سال ۱۳۷۷ انجام شد ۷۷/۵٪ از پشه خاکی‌ها فلپوتوموس سرزنتی بودند (۵). در مطالعاتی که توسط شریفی و همکاران از سال ۱۳۷۴ لغایت ۱۳۷۸ طی دو مرحله با هدف کارآزمایی واکسن کشته تک‌دوز و چنددوز در دانش‌آموزان شهر بم انجام شد، میزان شیوع زخم فعال در سال ۱۳۷۴ معادل ۱/۳٪ بوده و در سال‌های بعد تا سال ۱۳۷۸ تا میزان ۱٪ کاهش داشته است (۲۵،۲۷،۲۸). در بررسی که توسط افلاطونیان و شریفی بر روی فراوانی لیشمانیوز پوستی افراد مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت در شهر بم طی سالهای ۸۳-۷۹ انجام شد نشان داده شد که از یک سال بعد از زلزله موارد بیماری به‌طور معنی‌داری رو به افزایش بوده و تغییراتی هم در سیمای اپیدمیولوژیک بیماری از جمله سن و جنس ایجاد گردیده است (۴). در کابل این بیماری در پی حوادث طبیعی و تغییرات جمعیتی و محیطی به‌ویژه در مناطقی که به صورت آندمیک وجود داشته است با افزایش تدریجی به صورت اپیدمی بروز نموده و موجب نگرانی و هراس مردم و مسئولین گردید (۲۲). از آنجایی که اطلاعات و گزارشات غیرعلمی در شهر بم سبب نگرانی بیشتر مردم آسیب دیده و همچنین مسئولین بهداشتی و سیاسی گردیده بود، این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع لیشمانیوز پوستی در دانش‌آموزان انجام شد تا با ارزیابی وضعیت موجود و

معرفی می‌گردید. کارشناس آزمایشگاه از ضایعات پوستی به وسیله اسکالپل و تیغ شماره ۱۵ نمونه‌گیری کرده و پس از فیکس کردن لام و رنگ آمیزی با گیمسا، لام‌ها توسط متخصص انگل‌شناسی مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفت که در صورت مشاهده اجسام لیشمن در لام، آن دانش‌آموز بیمار شناخته می‌شد. بعد از تکمیل پرسش‌نامه مربوطه، دانش‌آموزان آلوده جهت درمان مناسب و پی‌گیری‌های بعدی به پزشکان مربوطه معرفی می‌شدند. داده‌های این مطالعه با نرم‌افزار SPSS به کامپیوتر وارد و با آمار توصیفی و آزمون کای‌دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

از ۳۰ مدرسه جمعاً ۴۹۳۱ دانش‌آموز معاینه شدند که ۴۹/۷٪ (۲۴۵۲ نفر) آنها پسر و ۵۰/۳٪ (۲۴۷۹ نفر) دختر بودند. ۳۳٪ در مقطع دبستان و ۲۵٪ در مقطع راهنمایی و ۴۲٪ در مقطع دبیرستان مشغول به تحصیل بودند. در مجموع میزان شیوع زخم حاد در بین دانش‌آموزان ۴/۹٪ بود که ۶۳/۴٪ آنها پسر و ۳۶/۶٪ آنها دختر بودند، به طوری که پسرها ۱/۸ برابر دخترها مبتلا بودند و اختلاف معنی‌داری را ($P > 0/001$) نشان دادند (جدول ۱). از بین ۲۴۳ نفر دارای زخم فعال ۸/۶٪ (۲۱ نفر) دارای زخم‌های برگشت‌کننده (لوپوئیدی) بودند که ۸۰/۹٪ (۱۷ نفر) از آنها پسر و ۱۹/۱٪ (۴ نفر) دختر بودند و اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند ($P > 0/005$). میزان شیوع اسکار (جای زخم) در بین دانش‌آموزان ۱۴/۱٪ بود که در مقطع راهنمایی به‌طور معنی‌داری ($P < 0/01$) از دبستان و دبیرستان بیشتر بود (جدول ۲). طبق نمودار ۱ میانگین تعداد زخم ۱/۵ بوده که ۷۴/۵٪ از مبتلایان یک زخم، ۱۷/۳٪ دو زخم و ۸/۲٪ سه زخم و یا بیشتر داشتند. در مجموع ۳۳/۸٪ از زخم‌ها روی صورت، ۴۷/۸٪ روی دست، ۱۴/۹٪ روی پا و ۳/۵٪ هم در سایر نقاط بدن وجود داشتند (نمودار ۲) که اختلاف

تغییرات اپیدمیولوژیک بیماری، مسئولین ذیربط بتوانند برنامه‌ریزی بهتری در زمینه‌های پیشگیری و کنترل لیشمانیوز پوستی در این شهر مصیبت زده داشته باشند.

روش بررسی

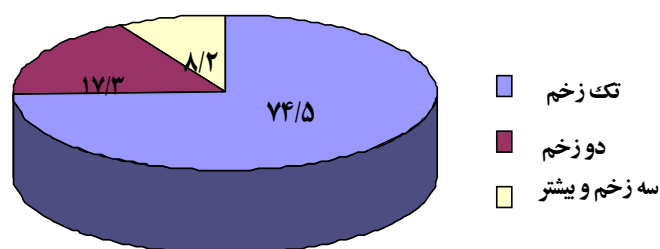
این مطالعه توصیفی تحلیلی است که با حجم نمونه ۴۹۳۱ نفر دانش‌آموز و به صورت مقطعی طی بهار ۱۳۸۵ انجام شده است. با هماهنگی آموزش و پرورش، شهر بم و بروات به پنج منطقه تقسیم گردیدند و از هر منطقه به صورت تصادفی از هر جنس و مقطع تحصیلی یک مدرسه در مجموع ۳۰ مدرسه با جمعیتی معادل ۵۱۰۰ نفر از بین ۱۲۵ مدرسه موجود، انتخاب شد. پنج تیم چهار نفره شامل دو نفر کارشناس بهداشتی و یک نفر تکنیسین و یک نفر راننده تعیین گردیدند. تمام اعضاء به تناسب تحصیلات آموزش‌های لازم را فرا گرفتند. دو نفر کارشناس آزمایشگاه آخرین روش‌های نمونه‌گیری، فیکس کردن، رنگ آمیزی با گیمسا و خواندن لام‌ها را توسط متخصص انگل‌شناسی آموزش دیدند. دو نفر پزشک عمومی زیر نظر متخصص پوست مسئولیت معاینات و درمان دانش‌آموزان را به عهده گرفتند. نیروهای اجرایی آموزش دیده از اسفندماه ۱۳۸۴ لغایت تیرماه ۱۳۸۵ به‌طور منظم و مطابق با برنامه پیش‌بینی شده و با هماهنگی و طبق لیست از قبل تهیه شده به مدارس مراجعه نمودند. تمام دانش‌آموزان به‌طور سیستماتیک و با رعایت اخلاق و به تناسب جنس تیم‌ها و نوع مدرسه در محل مناسبی معاینه شدند. بدین ترتیب دست‌ها تا بالای آرنج، پاها تا بالای زانو، سر، صورت و گردن و سایر نقاط، در صورت اظهار دانش‌آموز مبنی بر وجود زخم و یا هرگونه ضایعه پوستی مورد معاینه دقیق قرار می‌گرفتند. در صورت مشاهده هرگونه پاپول، ندول یا زخم در نقاط مختلف بدن برای وی فرم‌مظنون تکمیل می‌شد و با برگه ارجاع به مرکز پیشگیری و کنترل سالک جهت انجام آزمایش

جدول ۱: میزان شیوع زخم فعال در دانش‌آموزان بر حسب جنس و مقطع تحصیلی در شهر بم و بروات در بهار ۱۳۸۵

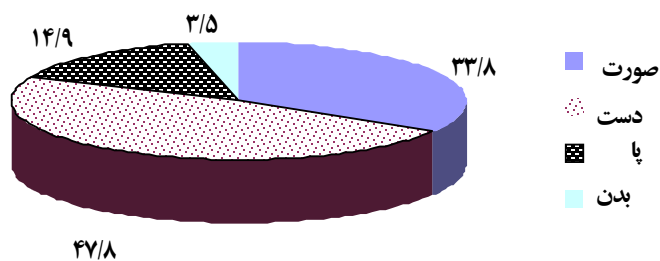
مقطع تحصیلی	تعداد موارد آزمایش شده		پسر		دختر		جمع
	پسر	دختر	تعداد	میزان شیوع	تعداد	میزان شیوع	
دبستان	۷۶۴	۸۶۴	۵۶	۷/۳	۴۴	۵/۱	۱۰۰
راهنمایی	۷۲۱	۵۱۱	۵۱	۷/۱	۱۶	۳/۱	۶۷
دبیرستان	۹۶۷	۱۱۰۴	۴۷	۴/۹	۲۹	۲/۶	۷۶
جمع	۲۴۵۲	۲۴۷۹	۱۵۴	۶/۲	۸۹	۳/۶	۲۴۳

جدول ۲: میزان شیوع اسکار در دانش‌آموزان بر حسب جنس و مقطع تحصیلی در شهر بم و بروات بهار ۸۵

مقطع تحصیلی	آزمایش شده		دارای اسکار		جمع	
	میزان شیوع	دارای اسکار	میزان شیوع	دارای اسکار	میزان شیوع	دارای اسکار
دبستان	۷۶۴	۷۵	۱۵	۱۳۰	۱۲/۶	۲۰۵
راهنمایی	۷۲۱	۱۴۴	۱۴/۸	۹۴	۱۹/۳	۲۳۸
دبیرستان	۹۶۷	۱۱۳	۱۲/۹	۱۴۲	۱۲/۳	۲۵۵
جمع	۲۴۵۲	۳۳۲	۱۴/۸	۳۶۶	۱۴/۱	۶۹۸



نمودار ۱: فراوانی دانش‌آموزان بر حسب تعداد زخم در شهر بم و بروات بهار ۸۵



نمودار ۲: فراوانی محل زخم در بین دانش‌آموزان مبتلا به لیشمانيوز پوستی در شهر بم و بروات بهار ۸۵

معنی داری بین دو جنس و مقاطع مختلف تحصیلی در هیچ یک از موارد فوق دیده نشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که لیشمانیوز پوستی در اواخر سال ۱۳۸۴ و در سال ۱۳۸۵ در شهر بم و بروات بصورت اپیدمی در آمده است و تفاوتی که در میزان شیوع آن در بین جنس مذکر و مؤنث و همچنین تعداد و محل زخم مشاهده می‌شود نشانه آن می‌باشد که احتمالاً چهره اپیدمیولوژیک بیماری در بم تغییر یافته است. نکته قابل توجه دیگر در این مطالعه اختلاف معنی دار دو جنس از نظر میزان فرم لوپوتیدی است که در پسرها چهار برابر دخترها می‌باشند گرچه تعداد ۲۱ نفر نمونه کافی برای اثبات تأثیر جنس نمی‌باشد اما می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات در این مورد باشد.

لیشمانیوز پوستی به‌ویژه نوع شهری آن به شدت از بلاهای طبیعی و دست‌ساز بشر مانند زلزله و جنگ متأثر می‌گردد (۲۳). نتایج این بررسی با یافته‌های مطالعات انجام شده بعد از زلزله ۱۹۳۵ در کوئته پاکستان که چند اپیدمی از لیشمانیوز پوستی نوع شهری گزارش شده است (۱۶) و یا افزایش چشم‌گیر میزان بروز لیشمانیوز پوستی شهری در کابل افغانستان بعد از جنگ هم‌خوانی دارد (۲۲). تغییرات زیست محیطی و اجتماعی از سال ۱۳۶۵ به بعد به علت ایجاد منطقه ویژه اقتصادی و ارگ جدید در ده کیلومتری شهر بم موجب مهاجرت و تغییرات جمعیتی و شهرسازی محسوس شد و در نتیجه به تدریج چهره اپیدمیولوژیک بیماری دستخوش تغییراتی گردید. میزان شیوع بیماری در بین دانش‌آموزان در سال ۱۳۶۸ به ۹٪ رسیده سپس به تدریج کاهش داشته و در سال ۱۳۷۱ به ۲٪ رسیده است (۳) و از آن سال به بعد و تا پایان سال ۱۳۸۳ میزان شیوع در دانش‌آموزان کمتر از ۱٪ بوده است (۴). در مطالعه سال ۱۳۷۰ موارد بیماری

در گروه سنی زیر یک‌سال به طور معنی داری از سنین بالا بیشتر بود بدین دلیل در این مطالعه شاهد میزان شیوع بالاتر اسکار در مقطع راهنمایی می‌باشیم (۳). متوسط تعداد زخم ۱/۵ بوده و ۴۶٪ زخم‌ها روی صورت، ۴۱/۶٪ روی دست و ۱۱/۴٪ روی پا بودند. همه موارد بین سال‌های ۱۳۶۷ لغایت ۱۳۷۱ و سال‌های بین ۱۳۷۹ لغایت ۱۳۸۳ تغییرات محسوس را نشان می‌دهد (۳،۴). ریورن و همکاران در کابل افغانستان در بررسی بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی نوع شهری در سال‌های بین ۱۹۷۶ لغایت ۱۹۹۶ نشان دادند که کمترین ابتلا در گروه سنی زیر ۲ سال و بیشترین ابتلا در گروه سنی بالای ۲۰ سال و افزایش در جنس مؤنث بیش از مذکر بوده است. افزایش میزان بروز عمدتاً به دلیل حضور مهاجرین بعد از جنگ و به صورت تدریجی صورت گرفته است. نکته قابل توجه در این مطالعه اینکه جنگ و بلایا به طور غیرمستقیم و به دلیل تغییرات جمعیتی و مهاجرت باعث تغییر در روند بیماری در مناطق حادثه دیده می‌شود و در واقع جابه‌جایی سریع جمعیت فاکتور بسیار مهمی در بروز اپیدمی‌های لیشمانیوز پوستی به شمار می‌رود (۲۲،۳۰). اگر چه زلزله دیماه ۱۳۸۲ علی‌رغم شدت و فراهم نمودن شرایط می‌توانست زمینه‌ساز یک اپیدمی بزرگ برای بازماندگان و تازه واردهایی که با هدف خدمت به منطقه آمده بودند باشد، برقراری نظام مراقبت ویژه و اقدامات مؤثر مبتنی بر تحقیقات و تجربیات دوازده ساله قبل از زلزله احتمالاً باعث کنترل بیماری گردید به طوری که میزان شیوع بیماری بسیار پایین‌تر از حد انتظار می‌باشد. به طوری که براساس پیش بینی کارشناسان و مقایسه فراوانی بیماری در شرایط مشابه با سایر کشورها بوده است (۱۶). احتمالاً اقدامات بهداشتی به‌موقع در کنترل نسبی بیماری مؤثر بوده است. امیدواریم با شناخت هرچه بیشتر عامل و ناقل بیماری به‌ویژه تعیین مقاومت و سطح حساسیت آنها به دارو و سموم و همچنین شناسایی احتمالی سایر

سیاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی و فنی مرکز تحقیقات لیشمانیوز و پایگاه تحقیقات جمعیت HSR حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تقدیر نموده و از همه عزیزانی که در مسیر مراحل اجرایی ما را کمک نمودند سپاسگزاریم.

مخازن در کنار بررسی‌های اپیدمیولوژیک بتوان به برنامه‌های پیشگیری، کنترل، درمان و لیشمانیوز پوستی در بم کمک کرد. در غیر این صورت با توجه به شرایط پیش آمده شاهد بروز اپیدمی‌های تدریجی بیماری در این شهر آسیب دیده خواهیم بود.

Summary

Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in School Children in Bam and Barawat/Iran in 2006

Aflatoonian MR., MPH¹., Sharifi I., PhD²

1. Academic Member, Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, and Health Services Kerman, Iran. 2. Professor of Parasitology, Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Introduction: Cutaneous leishmaniasis is an important public health problem in many tropical and sub-tropical countries including Iran. In Iran, it presents in two forms of anthroponotic CL (ACL) and zoonotic CL (ZCL). Bam is one of the oldest foci of ACL and the earthquake of 2003 December, 26th made a significant change in the population and environmental factors and subsequently in epidemiological feature of the disease. The objective of this study was to assess the prevalence of CL in school children and treatment of patients. The results of this study can be used for prevention and planning future control programs in the district of Bam.

Methods: The survey was conducted as a cross-sectional descriptive study during spring 2006. A total of 4931 children from 30 primary schools (6-10 years), elementary schools (11-14 years) and high schools (15-18 years) were selected randomly and examined physically in Bam and Barawat. The suspected CL cases were referred to the CL clinic. Smear scrapings were taken from the active lesions for direct microscopic examination and treatment of the confirmed cases. A questionnaire was completed for each case, indicating demographic and medical aspects. SPSS software was used for data entry and further analysis. The χ^2 test was used to determine any significant difference in disease prevalence.

Results: In whole, 4.9% of the school children had active lesions and there was a significant difference between boys (6.3%) and girls (3.6%) in this regard ($P < 0.01$). Lupoid lesions were significantly more in boys comparing to girls (80.9% versus 19.1%, $P < 0.005$). The prevalence rate of scar in students was 14.9% and there was a significant difference in this regard between elementary schools children and the children in two other levels ($P < 0.05$). In whole, 74.5% had one lesion, 17.3% had two lesions and 8.2% had three or more lesions. Hand was the most frequent site of involvement (47.8%), followed by face (33.8%), legs (14.9%) and other body parts (3.5%).

Conclusions: The present study indicated that the epidemiological features of CL have changed significantly as compared to the previous reports. The main differences are higher prevalence rate of the disease, particularly in boys than girls and significant higher rate of lupoid lesions in boys rather than girls. Moreover, the number and location of lesions and the clinical features of the

disease have been changed significantly. These findings emphasize further researches on epidemiological aspects especially on causative agent, host and suspected accidental hosts for future planning and implementation of suitable control programs.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, Prevalence Rate, School children, Bam

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 82-89

منابع

۱. اردهالی، صدرالدین؛ رضائی، حمیدرضا و ندیم، ابوالحسن: انگل لیشمانیا و لیشمانیوز. چاپ دوم، تهران، مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳۷۳، ص ۲۰۹.
۲. افسر کازرونی، پروین؛ علی اکبرپور، محسن و قره چاهی، محمدعلی: بررسی اپیدمیولوژیک چگونگی توزیع جغرافیایی سالک پوستی براساس سیستم اطلاعات جغرافیایی در استان فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سومین کنگره اپیدمیولوژی ایران، اردیبهشت ۸۵، کرمان، ص: ۳۲.
۳. افلاطونیان، محمدرضا: بررسی وضعیت لیشمانیوز جلدی در شهرستان بم. پایان نامه MPH. دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۱.
۴. افلاطونیان، محمدرضا؛ شریفی، ایرج: فراوانی لیشمانیوز پوستی افراد مراجعه کننده به مرکز بهداشت در شهر بم طی سالهای ۱۳۸۳-۱۳۷۹. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، جلد پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۵، ص: ۱۲۸-۱۲۳.
۵. آقاسی، محمد و شریفی، ایرج: بررسی خون و فعالیت ماهیانه پشه خاکی ها به عنوان ناقلین لیشمانیوز پوستی در شهر بم در سال ۱۳۷۷. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سال ۱۳۸۲، دوره دهم شماره ۲، ص ۸۵-۹۱.
۶. امامی، محمدمتولی؛ نیلفروزراده، محمدعلی و آقاسی، محمد: بررسی اپیدمیولوژیک بیماری لیشمانیوز جلدی در یک کانون جدید شهری در استان اصفهان. مجله علوم پزشکی کرمان، سومین کنگره اپیدمیولوژی ایران، اردیبهشت ۸۵، کرمان، ص: ۱۸۱.
۷. درودگر، عباس؛ دهقانی، روح الله؛ هوشیار، حسین و سیاح، منصور: بررسی شیوع لیشمانیوز جلدی در منطقه جنوب شرق کاشان. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سال ۱۳۷۵، دوره سوم، شماره ۲، ص ۸۰-۸۶.
۸. رنجبر توتونی، علی اصغر و سلطانی، علی محمد: بررسی اپیدمیولوژیک لیشمانیوز جلدی (سالک) در اپیدمی پاییز ۱۳۸۳ در منطقه نوق رفسنجان. مجله علوم پزشکی کرمان، سومین کنگره اپیدمیولوژی ایران، اردیبهشت ۸۵، کرمان، ص: ۹۵.
۹. سازمان مدیریت و برنامه ریزی: سالنامه آماری کرمان سال ۱۳۸۱.
۱۰. عسکری، قاسم؛ مقصدیان، محمدحسین و مهربانی، داوود: شناسایی مخازن لیشمانیا ماژور با استفاده از روش های ملکولی در بخش خرام شهر شیراز. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سومین کنگره اپیدمیولوژی ایران، اردیبهشت ۸۵، کرمان، ص: ۱۸۵.
۱۱. محبوبی، سعید؛ نعمتیان، محمود و رجبی، جواد: سیمای ۵ ساله لیشمانیوز جلدی در شهر کاشان. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، سومین کنگره اپیدمیولوژی ایران، اردیبهشت ۸۵، کرمان، ص: ۱۸۵.
۱۲. ندیم، ابوالحسن و سیدی رشتی، محمدعلی: لیشمانیوز جلدی در خراسان. مجله بهداشتی ایران. ۱۳۵۱، سال اول، شماره دوم. *Online J* 2006; 12(3): 14.
13. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SM, Sharifi I : Charactrization of leishmania isolated in Iran: 1. serotyping with species specific monoclonal antibodies. *Acta Tropica* 75, 2000; 75(3): 301-307.
14. Aytekin S, Ertem M, Yagdiran O, Aytekin N. Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Diarbakir Turkey. *Dermatol*
15. Berger F, Romary P, Brachet D, Rapp C, Imbert P, Garrabe E, et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in military population coming back from French Guiana. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2006; 54(3): 213-21.
16. Masoom M, Marri SM. Current status of

- leishmaniasis in Pakistan. Current trends in leishmaniasis research calcuta, India: Council of Scientific and India Trial Research: 1993. pp: 231-6.
17. Momeni AZ, AminiJavaheri M. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *Int J Dermatol* 1994; 33(4): 260-5.
 18. Nadim A, Aflatoonian, MR. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, southeast Iran. *Iranian Journal Bull Health* 1995; 4(1-2): 15-24.
 19. Nadim A, Faghieh M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62(4): 534-42.
 20. Nadim A, Motabar M, Houshmand B, Aflatoonian MR, Keighobadi K: Evaluation of pyrethroid impregnated bednets for control of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam. *Who/Leish*, 95. 37, 1995.
 21. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996; 22(1): 1-13.
 22. Reyburn H, Rowland M, Mohsen M, Khan B, Davies C. The prolonged epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: Bringing down the neighbourhood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97 (2): 170-6.
 23. Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet infect Dis* 2006; 6(6); 342-9.
 24. Seyedi-Rashti MA, Keighobadi K, Nadim A. Urban cutaneous leishmaniasis in Kerman, Souteats Iran. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1984, 77: 312-319.
 25. Sharifi I, Fekri AR, Aflatoonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Nousavi MR, et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed leishmania major plus BCG against anthroponotic catanous leishmaniasis in Bam. Iran. *Lancet* 1998; 351(9115): 1540-1543.
 26. Sharifi I, Ardehali S, Morazadian H, Aflatoonian MR, Keyghobadi K. Identification and Characterization of leishmania isolated school children in Bam, Southeastern Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 1997, 22 (33, 84): 82-88.
 27. Sharifi I, Fekri AR, Aflatoonian MR, Nadim A, Nikian Y, Khamesipour A. Cutaneous leishmaniasis in primary school children in the south-eastern Iranian city of Bam, *Bull World Health organ* 1998, 76(3): 289-93.
 28. Sharifi I, Mahboudi F, Fekri A, Aflatoonian MR. Lupoid leishmaniasis in school children in Bam, southeast Iran. *Crete-Greece* May2001, 20-24.
 29. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Studies on sandflies in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Indian J Med Res* 1997; 105: 61-6.
 30. WHO: Cutaneous leishmaniasis, Afghanistan. *Wkly Epidemiol Rec* 2002; 77(29): 246.
 31. WHO: Control of the leishmaniasis, report of a WHO expert committee, technical report series 1990, 793: 15-16, 58.

بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن سرکوبگر تومور TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری در بیمارستان افضل‌پور کرمان

دکتر غلامعباس محمدی^۱، علی وزیری گهر^{۲*}، دکتر محمدرضا شکیبائی^۳ و دکتر مسعود بقائی^۴

خلاصه

مقدمه: سرطان ریه دومین سرطان شایع در زنان پس از سرطان پستان و همین‌طور در مردان پس از سرطان پروستات است. از بین تمامی ژن‌هایی که در سرطان ریه دچار جهش می‌شوند، ژن TP53 که در موقعیت ۱۷p۱۳/۱ قرار دارد از اهمیت تشخیصی و پیش‌آگهی قابل توجهی برخوردار است و جهش‌های این ژن از جمله وقایع کلیدی در سرطان زایی ریه به حساب می‌آیند. در این مطالعه، نوع و میزان جهش‌های احتمالی موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری در بیمارستان افضل‌پور کرمان بین سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۴ مورد بررسی قرار گرفت. روش: پس از دریافت بلوک‌های پارافینی حاوی تومور بافت ریه تثبیت شده با فرمالین، DNA آنها استخراج گردید و پس از تکثیر اگزون‌های ۵ و ۸ توسط روش PCR، توالی بازهای آنها تعیین گردید. یافته‌ها: آنالیز نتایج تعیین توالی نشان داد که در ۱۸ نمونه از ۲۲ نمونه (۸۱/۸ درصد) در اگزون ۵ و در ۱۵ نمونه از ۱۸ نمونه (۸۳/۳ درصد) در اگزون ۸ ژن TP53 جهش وجود دارد. از مجموع ۶۴ کدون جهش یافته در اگزون ۵ نمونه‌های فوق، جهش در کدون‌های ۶ (۱۷ درصد)، ۱۴ (۷/۸ درصد) و ۲۵ (۴/۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند و همچنین از مجموع ۴۶ کدون جهش یافته در اگزون ۸ نمونه‌های فوق، کدون‌های ۲ (۱۳ درصد)، ۲۷ و ۳۵ (هر کدام ۱۰/۸۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند. نتیجه‌گیری: جهش‌های ژن TP53 در بیماران مورد مطالعه، شیوع نسبتاً بالایی در مقایسه با سایر مطالعات داشتند. این امر ممکن است به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و اختلافات موجود در عوامل محیطی و پارامترهای اپیدمیولوژیکی مانند نحوه رژیم غذایی و شیوه زندگی باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن TP53، سرطان سلول سنگفرشی ریه، جهش

۱- دانشیار بوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- مربی بخش بوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، ۳- دانشیار ژنتیک مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

* نویسنده مسؤول: بخش بوشیمی، دانشکده پزشکی افضل‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: a_vaziri@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۴ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۶

مقدمه

سرطان یک بیماری ژنتیکی است. چهار دسته از ژن‌های تنظیم کننده، هدف عمده آسیب‌های ژنتیکی قرار می‌گیرند که عبارتند از پروتوآنکوژن‌ها، ژن‌های سرکوبگر سرطان یا آنتی انکوژن‌ها، ژن‌هایی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها را تنظیم می‌کنند و ژن‌هایی که ترمیم DNA آسیب دیده را بر عهده دارند. امروزه به خوبی مشخص شده است که شرایط محیطی و تغییرات ژنتیکی با ایجاد فنوتیپ بدخیمی ارتباط دارند (۸).

سرطان ریه دومین سرطان شایع در زنان (پس از سرطان پستان) و همین‌طور در مردان (پس از سرطان پروستات) است. سرطان ریه دو نوع مختلف دارد که از لحاظ بالینی، بافت‌شناسی، ژنتیکی و بیوشیمیایی کاملاً از هم متمایز می‌باشند. سرطان ریه سلول غیر کوچک [Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)] که حدود ۷۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه را در بر می‌گیرد و شامل سرطان‌های سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinoma) و غده‌ای (Adenocarcinoma) و سلول بزرگ (Large cell carcinoma) می‌باشد. نوع دیگر سرطان ریه، سرطان ریه سلول کوچک [Small Cell Lung cancer (SCLC)] است که ۲۵ درصد مابقی بیماران مبتلا به سرطان ریه را شامل می‌شود. بیماران مبتلا به این نوع، سریعاً دوره رشد را پشت سر گذاشته و میانگین طول عمر بیماران درمان نشده، کمتر از ۴ ماه می‌باشد (۳).

ژن TP53 شناخته شده ترین ژن سرکوبگر تومور است که در موقعیت ۱۷p۱۳/۱ یعنی در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ و در باند ۱۳ و زیر باند اول قرار دارد و شایع‌ترین هدف تغییرات ژنتیکی در تومورهای انسانی است. این ژن دارای ۱۱ اگزون می‌باشد و فسفو پروتئین هسته‌ای موسوم به پروتئین P53 با وزن ملکولی ۵۳ کیلو دالتون را تولید می‌نماید. این ژن در تمام بافت‌ها اما به میزان متفاوت رونویسی می‌گردد. محصول این ژن دارای ۳۹۳ اسید آمینه و چندین ناحیه ساختمانی و عملکردی است. پروتئین P53 در هسته قرار دارد و هنگامی که وارد عمل می‌شود باعث کنترل رونویسی چندین ژن می‌گردد. از این دسته ژن‌ها

می‌توان به ژن‌های BAX, WAF-1/CIP-1, FAS/APO-1, MDM2, PIG3 و خود TP53 اشاره کرد (۳،۴،۷).

آسیب DNA سلول باعث تجمع و فعال شدن پروتئین p53 شده و به DNA آسیب یافته متصل می‌گردد و سپس رونویسی چندین ژن مانند ژن WAF1 را فعال می‌کند. این ژن پروتئین p21 را که یک مهارکننده کیناز وابسته به سایکلین می‌باشد تولید می‌کند. پروتئین p21 فعالیت پروتئین کینازی سایکلین - کیناز وابسته به سایکلین را مهار می‌نماید. در نتیجه در حضور پروتئین p21، پروتئین رتینوبلاستوما غیر فسفریله باقی می‌ماند و به فاکتور نسخه‌برداری E2F-1 متصل می‌شود و از ورود سلول به مرحله همانندسازی جلوگیری نموده و سلول را در مرحله G1 چرخه سلولی نگه می‌دارد (۸).

اگر در طی وقفه در تقسیم سلولی، آسیب DNA با موفقیت ترمیم نگردد، پروتئین p53 به عنوان آخرین تلاش با القای فعالیت ژن‌های ایجاد کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سلول را نابود می‌کند. ژن‌های BAX و IGF-BP3 دو ژن پاسخ‌دهنده به پروتئین p53 هستند که دستور مرگ سلولی توسط p53 را اجرا می‌کنند (۵،۱۳،۱۸).

با مطالعات سائتوژنتیک بر روی موقعیت ۱۷p۱۳/۱ کروموزوم‌های سلول‌های تومور مشخص گردید که در اکثر انواع سرطان‌ها مخصوصاً سرطان‌های ریه، روده بزرگ و پستان (سه علت اول مرگ در اثر سرطان) این ناحیه از کروموزوم دچار اختلال گردیده است. این واقعیت که جهش‌های ژن TP53 در بسیاری از تومورهای انسانی وجود دارد مؤید این است که پروتئین p53 یک محافظ حیاتی در برابر تشکیل تومور است. با بررسی بر روی بسیاری از نمونه‌های تومور ریه مشخص شده است که در ۱۰۰ درصد سرطان‌های ریه سلول کوچک و در ۵۰ تا ۷۰ درصد سرطان‌های ریه سلول غیر کوچک ژن TP53 دچار جهش شده است (۸-۳).

سلول‌هایی که در آنها ژن TP53 در اثر ایجاد جهش و یا از دست رفتن هموزیگوتی غیر فعال شده است در صورت آسیب DNA، توانایی ترمیم آسیب و حذف سلول

پس از تخلیه اتانول، لوله حاوی بافت با درب باز در فور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا بافت‌ها کاملاً خشک گردند و به این طریق بافت‌ها کاملاً عاری از پارافین شدند.

۳. هضم بافت‌ها

محلول هضم‌کننده‌ای حاوی ۴۰ میلی‌مولار تریس (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار EDTA (سیناژن، ایران) و نیم درصد توئین-۲۰ (سیگما، امریکا) ساخته شد. پس از تهیه محلول فوق، pH آن روی ۸ تنظیم گردید و سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از آن، ۲۰ میکرولیتر محلول پروتئیناز K (۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بایونیر، کره جنوبی) اضافه شد و پس از بهم زدن مختصری در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لوله هر نیم ساعت یکبار، با سروته کردن مخلوط شد تا اینکه در نهایت بافت‌ها به صورت محلولی شفاف و یکنواخت درآمدند. سپس برای غیر فعال کردن آنزیم پروتئیناز k، لوله به مدت ۵ دقیقه در بنماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA، چندین روش مورد ارزیابی قرار گرفتند که در نهایت استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا محلول فنل با محلول تریس مخلوط گردید تا pH فنل به حدود ۸ رسید و به این ترتیب فنل اشباع آماده گشت (۸،۹). سپس هم حجم بافت هضم شده موجود در لوله، فنل اشباع افزوده و لوله به مدت ۱۰ دقیقه روی روتاتور قرار داده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از بیرون آوردن لوله از سانتریفیوژ، حدود ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله دیگری منتقل و روی آن ۲۵۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم (۱:۱) افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی روتاتور قرار داده و به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به لوله دیگری منتقل شد و معادل ۲/۵ برابر آن، اتانول سرد خالص (۴ درجه سانتی‌گراد) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله از فریزر خارج کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g و در ۴ درجه

با فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را ندارند و در نتیجه آسیب DNA می‌تواند به سوی تشکیل و تکامل تومور پیش رود (۱).

با توجه به تأثیر عوامل محیطی و جغرافیایی در وقوع و میزان شیوع سرطان‌ها، در این تحقیق نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون‌های ۵ و ۸ ژن سرکویگر تومور TP₅₃ در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه که بین سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۴ در بیمارستان افضل‌پور کرمان بستری شده و مورد جراحی قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه ۳۰ بلوک پارافینی تثبیت شده با فرمالین که حاوی مقدار کافی تومور سلول سنگفرشی ریه بوده و از بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه بستری شده در بیمارستان افضل‌پور کرمان طی سال‌های ۸۴-۱۳۷۶ مورد استفاده قرار گرفتند.

پارافین‌زدائی از نمونه‌ها و استخراج DNA با استفاده از تلفیق چند روش صورت گرفت (۲،۴،۹،۱۲). در زیر مراحل مختلف انجام این مطالعه ارائه می‌گردد.

۱. پارافین زدایی از بافت‌ها

حدود ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم از بافت موجود در نمونه‌های تثبیت شده پارافینی با میکروتوم و یا تیغ جراحی به صورت نازک با ضخامتی در حدود یک میلی‌لیتر برش داده شده و به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. بافت‌ها سه بار با زایلن (شرکت مرک، آلمان) و در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند تا پارافین موجود در بافت‌ها در زایلن حل شود و سپس تخلیه شدند.

۲. حذف زایلن از بافت‌ها

برای حذف زایلن، بافت‌ها با اتانول خالص (شرکت مرک، آلمان)، اتانول ۹۰ درصد، ۷۰ درصد و ۵۰ درصد به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و در پایان لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ گردیدند و اتانول داخل لوله‌ها تخلیه گردید.

پرایمرهای رشته پایه و پیرو (ایزوژن، هلند) هر کدام با غلظت یک میکرومولار و حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده از تومورها ساخته شد.

برای تکثیر آگزون ۵ (به طول ۱۸۴ جفت باز) و آگزون ۸ (به طول ۱۳۸ جفت باز) ژن TP53 از دستگاه ترمال سایکلر (کوریت، استرالیا) و از روش Touch down PCR استفاده گردید برای این منظور ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۳ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس سیکل‌های PCR آغاز گشتند که در هر کدام ابتدا ۱ دقیقه حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه حرارت ۶۸ درجه سانتیگراد (این دما در سیکل‌های دیگر کاهش یافته و تا ۶۱ درجه سانتیگراد کاهش می‌یابد)، ۲ دقیقه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد و در پایان سیکل‌ها نیز به منظور استفاده بیشتر از مواد اولیه مخلوط ۵ دقیقه حرارت ۷۲ درجه اعمال گردید.

۷. الکتروفورز و تعیین توالی محصولات PCR

محصولات حاصل از تکثیر ۳۰ بلوک پارافینی تثبیت شده با فرمالین، روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد، الکتروفورز شدند.

پس از مشاهده باندهای حاصل از تکثیر آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53، مشخص گردید که عمده توالی‌های تکثیر یافته، حاوی باندهای اختصاصی آگزون‌های مورد نظر بودند و تنها تعداد اندکی از نمونه‌ها باند غیر اختصاصی داشتند که یا مجدداً تحت واکنش PCR قرار گرفتند و یا آن قسمتی از ژل الکتروفورز که حاوی باند اختصاصی مورد نظر بود از طریق شرکت تکاپو زیست به شرکت تک دراگون (Techdragon Co.) در هنگ کنگ فرستاده شد و توسط دستگاه ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer و کیت ABI PRISM® Big Dye™ Terminators V3.1 تعیین توالی شدند.

نتایج

در شکل ۱، DNA استخراج شده و باندهای DNA تکثیر یافته آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 یکی از بافت‌های تثبیت شده در فرمالین سرطان سلول سنگفرشی ریه به عنوان نمونه

سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. پس از تخلیه اتانول، رسوب سفید رنگ (DNA) ته لوله دوبار به آرامی با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. سپس لوله به صورت دریاژ در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد تا کاملاً خشک گردد. بسته به میزان رسوب DNA مقدار ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه در لوله ریخته و در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شد تا DNA حل گردد.

۵. الکتروفورز DNA

بعد از انجام مراحل فوق برای حصول اطمینان از موفقیت آمیز بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۰/۶ درصد حاوی نیم میکروگرم/میلی‌لیتر برومور اتیدیوم و بافر TBE (با غلظت ۱x) صورت گرفت (۸،۹). برای انتقال DNA استخراج شده به ژل، محلول حاوی DNA به نسبت مساوی با بافر نمونه‌گذاری مخلوط و به چاهک‌هایی درون ژل انتقال داده شد. نمونه‌گذاری با استفاده از بافر SBX شامل ۵۰ درصد سوکروز (مرک، آلمان)، ۰/۲۵ درصد برموفل بلو (مرک، آلمان) و ۰/۲۵ درصد زایلین سیانول (مرک، آلمان) صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به ژل، الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۱ ساعت انجام و سپس وجود DNA با استفاده از آشکارساز نور UV مشخص شد.

۶. واکنش PCR

در ابتدا، پرایمرهای زیر برای تکثیر آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 طراحی گردیدند.

Exon 5- Forward: 5'-TCT-GTT-CAC-TTG-TGC-CCT-GAC-TTT-CAA-C-3'

Exon 5- Reverse: 5'-GCA-ACC-AGC-CCT-GTC-TCT-CCA-3'

Exon 8- Forward: 5'-GTA-GGA-CCT-GAT-TTC-CTT-ACT-GCC-3'

Exon 8- Reverse: 5'-TGA-GGC-ATA-ACT-GCA-CCC-TTG-GTC-T-3'

واکنش PCR در شرایط زیر صورت گرفت:

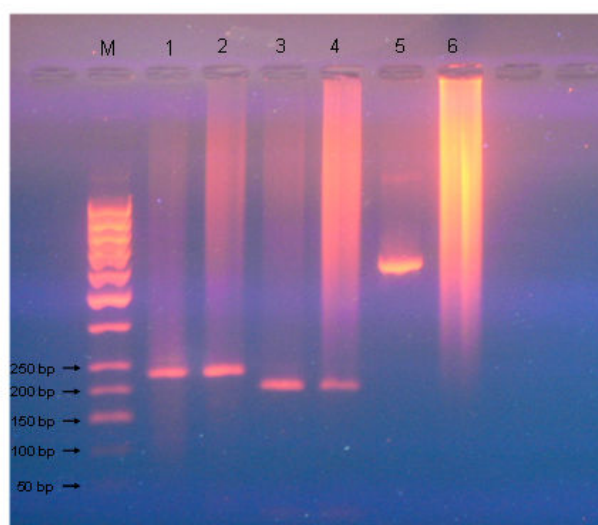
مخلوط PCR در حجم ۲۵ مایکرولیتر که شامل بافر PCR (سینازن، ایران) با غلظت یک x، مخلوط انواع بازهای DNA (سینازن، ایران) با غلظت ۰/۲ مولار، کلرید منیزیم (سینازن، ایران) با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (فرمنتاس، لیتوانی) و

استفاده تولید نمودند. از ۲۲ نمونه مربوط به آگزون ۵، ۶۴ کدون جهش یافته شناسایی گردید که مجموعاً در آنها ۷۳ جهش اتفاق افتاده بود، که از این بین تعداد ۴ نمونه هر کدام با یک جهش، ۷ نمونه هر کدام با دو جهش، ۲ نمونه هر کدام با ۳ جهش، ۲ نمونه با ۴ جهش، یک نمونه با ۸ جهش، یک نمونه با ۱۱ جهش و یک نمونه با ۲۲ جهش شناسایی گردید. نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ در جدول ۱، نشان داده شده است.

نشان داده شده است. پرایمرها در حدود ۵۰ جفت باز پیش از محل شروع آگزون‌ها طراحی گردیدند و به این ترتیب اندازه باندهای حاصله نیز حدود ۵۰ جفت باز افزایش یافتند.

۱. نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ ژن TP₅₃

در مجموع از ۲۵ نمونه مورد استفاده در تعیین توالی، ۲۲ نمونه برای آگزون ۵ و ۱۸ نمونه برای آگزون ۸ نتایج قابل



شکل ۱: DNA استخراج شده و باندهای DNA تکثیر یافته یکی از بافت‌های تشبیه شده با فرمالین در ژل آگارز ۲/۵ درصد. (M) مارکر DNA (۱ و ۲) آگزون ۵ تکثیر یافته ژن TP₅₃، (۳ و ۴) آگزون ۸ تکثیر یافته ژن TP₅₃، (۵) کنترل مثبت تکثیر یافته و (۶) DNA ژنومی استخراج شده از بافت.

جدول ۱: نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۵ ژن TP₅₃

C→A	T→A	C→T	اضافه شدن نوکلئوتید	A→C	A→T	G→C	G→A	G→T	حذف نوکلئوتید	نوع جهش
										فراوانی
۱	۲	۲	۳	۴	۷	۱۲	۱۲	۱۳	۱۷	تعداد
٪۱/۴	٪۲/۸	٪۲/۸	٪۴/۱	٪۵/۴	٪۹/۵	٪۱۶/۴	٪۱۶/۴	٪۱۷/۸	٪۲۳/۲	درصد

جدول ۲- نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ ژن TP₅₃

C→T	اضافه شدن نوکلئوتید	حذف نوکلئوتید	A→T	G→T	نوع جهش فراوانی
۱	۴	۱۰	۱۶	۱۶	تعداد
٪۲/۱	٪۸/۵	٪۲۱/۳	٪۳۴	٪۳۴	درصد

همانطور که از جدول مشخص است از ۴۷ جهش مشاهده شده در آگزون ۸ به ترتیب اکثریت، تعداد ۱۶ جهش (۳۴ درصد) در هر یک از جهش‌های جابجایی گوانین با تیمین و جابجایی آدنین با تیمین، ۱۰ جهش (۲۱/۳ درصد) از نوع حذف نوکلئوتید، ۴ جهش (۸/۵ درصد) اضافه شدن تعداد نوکلئوتیدهای کدون و ۱ جهش (۲/۱ درصد) جانشینی سیتوزین با تیمین مورد شناسایی قرار گرفتند.

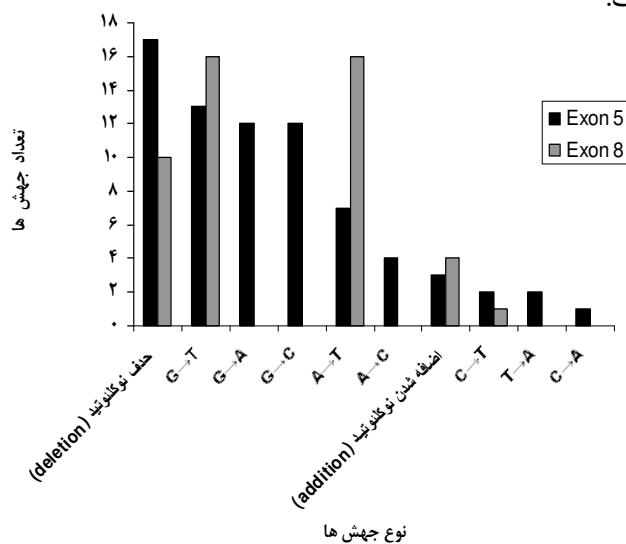
از مجموع ۴۶ کدون جهش یافته آگزون ۸ در ۱۸ نمونه، کدون‌های ۲ (۱۳ درصد)، ۲۷ (۱۰/۸۶ درصد) و ۳۵ (۱۰/۸۶ درصد) بیشترین شیوع را داشتند به عنوان کدون‌های مهم مطالعه حاضر معرفی گردیدند.

نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های احتمالی موجود در آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP₅₃ به طور مقایسه‌ای در نمودار ۱ نشان داده شده است.

از مجموع ۶۴ کدون جهش یافته در آگزون ۵ در ۲۲ نمونه، ۱۱ جهش در کدون ۶ (۱۷ درصد)، ۵ جهش در کدون ۱۴ (۷/۸ درصد) و ۳ جهش در کدون ۲۵ (۴/۶ درصد) مشاهده گردید. کدون‌های ۶، ۱۴ و ۲۵ که بیشترین شیوع جهش را داشتند به عنوان کدون‌های مهم [Hot Spot Codons] مطالعه حاضر تعیین شدند.

۲. نتایج حاصل از بررسی نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ ژن TP₅₃

از مجموع ۱۸ نمونه مورد استفاده در آگزون ۸، ۴۶ کدون جهش یافته شناسایی گردید که مجموعاً در آنها ۴۷ جهش اتفاق افتاده بود، که از این بین، ۵ نمونه هر کدام با یک جهش، چهار نمونه هر کدام با ۲ جهش، یک نمونه با ۳ جهش، دو نمونه هر کدام با ۴ جهش، یک نمونه با ۵ جهش، یک نمونه با ۶ جهش و یک نمونه با ۱۱ جهش شناسایی گردید. نوع و میزان جهش‌های موجود در آگزون ۸ در جدول ۲، نشان داده شده است.

نمودار ۱: تعداد و نوع جهش‌های موجود در آگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP₅₃

بحث

ژن TP53 مهم‌ترین ژن سرکوبگر تومور می‌باشد که در بسیاری از سرطان‌ها دچار جهش می‌شود. بیشتر جهش‌ها در ناحیه محافظت شده شدید [High Conserved Region] که شامل اگزون‌های ۵ تا ۸ می‌باشد رخ می‌دهند. این اگزون‌ها ایجاد کننده ناحیه مرکزی پروتئین p53 می‌باشند و نقش اصلی را در شناسایی DNA معیوب به عهده دارند. بنابراین هرگونه جهش در این اگزون‌ها، از اهمیت بالایی برخوردار است و باعث غیر فعال شدن یا نقص در عملکرد این پروتئین می‌شود و فرد بیمار را مستعد ایجاد طیف وسیعی (حدوداً ۶۵ درصد انواع سرطان‌ها) خواهد کرد (۴،۶).

پروتئین p53 یک فاکتور رونویسی چند کاره می‌باشد که در پیشرفت چرخه سلولی و فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارد و در ارتباط با چندین پروتئین کلیدی که در همانندسازی DNA، رونویسی و ترمیم DNA نقش دارند می‌باشد (۵).

افرادی که مبتلا به سندرم لی-فرا منی (Li-Fraumeni) هستند، در مقایسه با جمعیت طبیعی تا سن ۵ سالگی، ۲۵ برابر بیشتر احتمال ابتلا به یک تومور بدخیم را دارند و طیف ایجاد تومورها در بیماران مبتلا به سندرم لی-فرا منی بسیار متغیر است. شایع‌ترین انواع تومورها عبارتند از سارکوما، سرطان پستان، لوسمی، تومورهای مغز و کارسینوم‌های قشر فوق کلیه.

جهش ژن TP53 در ۵۰ تا ۷۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک شناسایی شده است. دیگر ژن‌های سرکوبگر سرطان که اختلال آنها در سرطان ریه سلول غیر کوچک شناسایی شده شامل ژن‌های RB1، PTEN و INK4 می‌باشد که به ترتیب در ۱۵-۱۰ درصد، ۵-۰ درصد و ۷۵ درصد بیماران دیده شده است (۳).

این نکته قابل توجه می‌باشد که بیش از ۷۵ درصد جهش‌های این ژن تغییرات تک اسید آمینه‌ای می‌باشد. این مطلب یک وجه تمایز این ژن با دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور مانند رتینوبلاستوما و APC می‌باشد که معمولاً دچار تغییرات در چارچوب (Frameshift) و جهش‌های خاموش (Silent)

(mutations) می‌شوند و توالی پروتئین را از بین می‌برند (۵). در مطالعات مشابه که در کشورهای مختلف صورت گرفته است، تاگاو و همکاران جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۹ ژن TP53 را در ۳۴ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک (۱۷)، گائو و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن TP53 را در ۳۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه (۴)، ماتسوزو و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 را در ۳۸ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک (۱۰) و نیکلینسکا و همکاران، جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ تا ۸ ژن TP53 را در ۴۵ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک شناسایی کردند (۱۱،۱۲).

در این مطالعه جهش‌های موجود در اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 با استفاده از روش‌های PCR و تعیین توالی DNA مشخص گردیدند و نتایج نشان دادند که فقط قسمت کوتاهی از ژن دچار تغییر شده است و بقیه توالی با ژن طبیعی مطابقت دارد و همچنین در تعدادی از نمونه‌ها ساختمان ژن هیچ نوع تغییری نداشته است، بنابراین می‌توان با اطمینان گفت که توالی‌های تکثیر شده همان اگزون‌های ۵ و ۸ ژن TP53 می‌باشند.

در ۱۸ نمونه از ۲۲ نمونه (۸۱/۸ درصد) در اگزون ۵ و در ۱۵ نمونه از ۱۸ نمونه (۸۳/۳ درصد) در اگزون ۸ ژن TP53، جهش وجود دارد و در مجموع تعداد ۱۲۰ جهش (۷۳) جهش در اگزون ۵ و ۴۷ جهش در اگزون ۸ ژن TP53 در بیماران مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ریه شناسایی گردید.

در مجموع حدود یک چهارم جهش‌ها (بیشترین نوع جهش) جابجایی گوانین با تیمین می‌باشد. پس از این نوع جهش، جهش حذف نوکلئوتید (۲۲ درصد) و جابجایی آدنین با تیمین (۱۹ درصد) بیشترین فراوانی را در جهش‌های شناسایی شده اگزون‌های ۵ و ۸ به خود اختصاص داده‌اند. بنابراین نوع جهش اصلی در این مطالعه، مطابق با گزارش‌های پیشین در مورد بیماران مبتلا به

سرطان ریه می‌باشد.

نتایج نشان دادند که جهش‌های این ژن در بیماران بستری شده در بیمارستان افضل‌پور کرمان در مقایسه با سایر مطالعات شیوع بالایی داشتند. این امر ممکن است به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و اختلافات موجود در عوامل محیطی مانند رژیم غذایی، میزان استرس، شرایط جغرافیایی و شیوه زندگی مردم باشد.

وجود درصد بالای جهش جابجایی گوانین با تیمین (G→T) در ژن TP53 به مصرف بالای دخانیات و خاصیت جهش‌زایی ترکیب PAH در دود سیگار بر می‌گردد. رودین و همکاران و همچنین دیگر پژوهشگران نشان داده‌اند که ژن سرکوبگر تومور TP53 در بیماران مبتلا به سرطان ریه افزایش قابل توجهی در جهش جابجایی گوانین با تیمین دارد که این نوع جهش به سبب فعالیت ترکیب جهش‌زای PAH می‌باشد. شیوع بالای این جهش خاص در ارتباط با مصرف سیگار می‌باشد و مخصوصاً مشخص شده است که مصرف سیگار ممکن است مهار کننده ترمیم جهش جابجایی گوانین با تیمین در رشته غیر رونویسی شونده باشد. همچنین وجود درصد بالای جهش‌های جانیشینی گوانین با آدنین (G→A) در آگزون ۵ ژن TP53، در ارتباط با وجود نیتروزو آمین خاصی در دود سیگار به نام NNK می‌باشد که اهمیت این ماده در سرطان زایی ریه مشخص شده است (۱۶-۱۴).

جهش‌های جابجایی گوانین با تیمین و سیتوزین با آدنین در اثر جهش‌زایی مانند PAH و انواع گونه‌های اکسیژن فعال [Reactive Oxygen Species (ROS)] می‌باشد. PAH از عوامل جهش‌زای اصلی در سرطان‌زایی ریه می‌باشد. اثر متابولیت‌های PAH مانند benzo(a)pyrene-diol-epoxide روی رشته غیر رونویسی شونده [Non-transcribed strand (NTS)] باعث می‌شوند تا ترمیم آسیب‌های این رشته، ۲ تا ۴ مرتبه آهسته‌تر از رشته دیگر صورت گیرد و با جهش‌های هات‌اسپات (جهش‌های شایع) مشاهده شده در سرطان ریه

انسانی مرتبط باشد (۱۶، ۱۸).

نقص هموزیگوت و هتروزیگوت در ژن TP53 حیوانات، در ابتلاء به تومورهای خود به خودی با شیوع بالا همراه می‌باشد. تمامی حیواناتی که خاموش شدن ژن TP53 آنها به صورت هموزیگوت و در حین شش ماه اول زندگی‌شان صورت می‌گیرد، به طور غالب در اثر ابتلا به لنفوما خواهند مرد و در آنهایی که خاموش شدن ژن TP53 آنها به صورت هتروزیگوت می‌باشد، به تومورهای مختلفی دچار می‌گردند که در بین این تومورها، سارکوما و لنفوما بیش از بقیه مشاهده می‌شود. دلیل بالا بودن شیوع سرطان در حیوانات دارای نقص در ژن TP53، با نقش این ژن به عنوان محافظ ژنوم سازگار است که از طریق مهار رشد و فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی فعالیت می‌نماید.

رنگ‌آمیزی پروتئین p53 به روش ایمونوهیستوشیمی، به عنوان یک آزمایش غیر مستقیم نشان داده است که بیان پروتئین جهش یافته در مخاط طبیعی، صفر درصد، در متاپلازی اسکوآموس ۸/۳ درصد، در دیسپلازی ملایم ۵ تا ۷ درصد، در دیسپلازی متوسط ۱۲/۵ درصد و در دیسپلازی شدید ۹۳/۸ درصد است (۳).

این مطالب نشان می‌دهند که غیر فعال شدن این ژن رخداد اولیه‌ای در سرطان ریه می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک مارکر ملکولی مفید در تشخیص زود هنگام بکار رود. شناسایی دیگر جهش‌های این ژن و مکانیسم‌های دخیل در ایجاد جهش‌ها، راه‌های جلوگیری از تشکیل جهش‌ها و همچنین فعال‌سازی این ژن می‌توانند راه را برای تشخیص و درمان سرطان هموار نمایند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقایان دکتر حمید تبریزی و دکتر شهریار دبیری و همچنین پرسنل محترم بخش پاتولوژی بیمارستان افضل‌پور کرمان به دلیل همکاری در تحویل نمونه‌های تثبیت شده فرمالینی و از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان نیز به سبب فراهم نمودن بودجه این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

Summary

Detection of Mutations in Exons 5 and 8 of Tumor Suppressor Tp₅₃ Gene in Patients with Squamous Cell Carcinoma of Lung Hospitalized in Afzalipour Hospital, Kerman, Iran

Mohammadi GH., PhD.¹, Vaziri Gohar A., M.Sc.², Shakibaie M.R., PhD.³, Baghaie M., MD.⁴

1. Associate Professor of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kerman Physiology Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 2. Instructor of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 3. Associate Professor of Molecular Genetics, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 4. Assistant Professor of Surgery, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences Kerman, Iran

Introduction: Despite improvements in the diagnosis and treatment of lung cancer in the past two decades, it has remained the most common cause of death from cancer worldwide. Among all genes that are mutated in lung cancer, TP₅₃ located on chromosome 17p13/1 has a significant diagnostic and prognostic value. TP₅₃ mutations have been extensively studied in lung cancer and TP₅₃ mutational spectra have been used for finding the origin(s) and mechanisms of these mutations in lung cancer development. The present study was conducted to investigate the TP₅₃ mutations in patients with Non- small cell lung cancer hospitalized during 1997-2005 in Afzalipour Hospital, Kerman, Iran.

Method: Formalin- fixed, Paraffin- embedded tissues from lung cancer patients undergone surgery between 1997 to 2005 were evaluated. The mutational status of the TP₅₃ gene (exons 5 & 8) was screened by polymerase chain reaction (PCR) analysis followed by sequencing.

Results: Of all cases of squamous cell carcinoma, 73 mutations were found in Exon 5 (in 18 cases) and 47 mutations in Exon 8 of TP₅₃ gene (in 15 cases). we identified mutation hot spot at codons 6, 14, 25 of exon 5 and codons 2, 27, 35 of exon 8 of TP₅₃ gene. Tansversions (G to T, A to T and G to C) and deletion mutations were the most in both exons 5 and 8. The incidence of G to T transversion mutations did not significantly differ between Exons 5 and 8.

Conclusion: Higher prevalence of mutations in TP₅₃ gene in the present study comparing to previous studies may be due to genetic, environmental and some epidemiological factors such as diet and life style of studied subjects.

Key words: TP53 Gene, Squamous cell carcinoma, Mutation

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 90-99

References

1. Brakensiek K, Langer F, Kreipe H, Lehmann U. Absence of p21(CIP1), p27(KIP1) and p57(KIP2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res* 2005; 29(11): 1357-60.
2. Cawkwell L, Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from formalin fixed, paraffin wax embedded tissue section. *Mol Pathol* 2000; 53(1): 51-2.
3. Cowell J.K: Molecular Genetics of Cancer. 2nd ed. BIOS Scientific Publishers Limited; 2001; PP195-212: 391-3.
4. Gao WM, Mady HH, Yu GY, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF, et al. Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer* 2003; 40(2): 141-50.
5. Glazko GV, Koonin EV, Rogozin IB. Mutation hotspots in the p53 gene in tumors of different origin: correlation with evolutionary conservation and signs of positive selection. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1679(2): 95-106.
6. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Tumor

- suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer* 2001; 34 suppl 2: S7-S15.
7. Ko JL, Chiao MC, Chang SL, Lin P, Lin JC, Sheu GT, et al. A novel p53 mutant retained functional activity in lung carcinomas. *DNA Repair* 2002; 1(9): 755-62.
 8. Macdonald F, Ford C.H.J. Molecular Biology of Cancer. BIOS Scientific Publishers Limited; 1997; PP35-40.
 9. Mahony JB: Detection of viral nucleic acids in clinical materials. In: Mahy BWJ, Kangro HO (editors). Virology methods manual. New York, Academic Press, 1996; PP327-28.
 10. Matsuzoe D, Hideshima T, Kimura A, Inada K, Watanabe K, Akita Y, et al. p53 mutations predict non-small cell lung carcinoma response to radiotherapy. *Cancer Lett* 1999; 135(2): 189-94.
 11. Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer: association with p53 gene mutation and prognosis. *Lung Cancer* 2001; 34(suppl 2): S59-S64.
 12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: *Globocan* 2000. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 153-6.
 13. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Wozniak K, Bednarek A, Pluciennik E, et al. GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 162(1): 63-7.
 14. Rodin SN, Rodin AS. On the excess of G→T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines, Reply to Pfeifer and Hainaut. *Mutat Res* 2004; 545(1-2): 141-4.
 15. Rodin S.N, Rodin A.S. On the origin of p53 G:C→T:A transversions in lung cancers. *Mutat Res* 2002; 508(1-2): 1-19.
 16. Rodin SN, Rodin AS. Origins and selection of p53 mutations in lung carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(2): 103-12.
 17. Tagawa M, Murata M, Kimura H. Prognostic value of mutations and a germ line polymorphism of the p53 gene in non-small cell lung carcinoma: association with clinicopathological features. *Cancer Lett* 1998; 128(1): 93-9.
 18. Wiseman A. p53 Protein or BID protein select the route to either apoptosis (programmed cell death) or to cell cycle arrest opposing carcinogenesis after DNA damage by ROS. *Med Hypotheses* 2006; 67(2): 296-9.

سنجش سمیت سلولی ۱۶ مشتق کینولون جدید بر مجموعه‌ای از رده‌های سلولی بدخیم در محیط کشت

سعید رجبعلیان^{۳*}، دکتر علی رضا فرومدی^۱، دکتر محمود رضا حیدری^۲، دکتر ریحانه کریم زاده^۴، دکتر عباس پرداختی^۵ و رفعت حسینی^۱

خلاصه

مقدمه: فلوروکینولون‌ها از قبیل سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین مهارکننده قدرتمند آنزیم توپوایزومراز II باکتریایی هستند. همچنین فلوروکینولون‌ها فعالیت آنزیم توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران را نیز مهار می‌کنند، که بدین ترتیب اثرات ضد توموری این گروه از ترکیبات قابل بررسی است.

روش: در مطالعه حاضر سمیت سلولی یک سری از مشتقات جدید فلوروکینولون بر شش رده سلولی بدخیم با روش سنجش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: مشتقات N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- اکسواتیل} (C1,N1,E1)، N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- تینیل} (C2,N2,E2) و N- {۲- (۵- برومو-۲- تینیل)-۲- فنیل} (C3,N3,E3) پیرازینیل کینولون‌ها بیشترین سمیت سلولی را با میانگین IC50 های برابر با ۲/۵ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند که با فعالیت داروی اتوپوزاید با IC50 برابر با ۱/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر هم‌تراز بود. کاهش فعالیت به دنبال جایگزینی ۵- برومو-۲- تینیل با ۴،۲- دی فلوروفنیل یا ۴- فلوروفنیل مشاهده شد. فعالیت کینولون به خصوص بر رده سلولی آدنوکارسینومای کلیه (ACHN) به دنبال اتصال یک اتم کلر و دو اتم فلور به گروه‌های بنزیل و فنیل افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه این سری از مشتقات کینولون را به عنوان مدل‌های مناسب برای طراحی ترکیبات ضد توموری جدید پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: فلوروکینولون، سنجش MTT، سمیت سلولی، اتوپوزاید

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- دانشیار داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران ۳- استاد سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۵- استادیار، دانشکده داروسازی و مرکز فن آوری فرماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

* نویسنده مسؤل: مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: srajabalian@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۱۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۲/۱ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۱/۲۲

مقدمه

DNA توپوایزومرازها برای بقاء و تکثیر سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی ضروری هستند. ترکیبات شیمیایی فلوروکینولون از قبیل سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین دارای اثرات ضد میکروبی شناخته شده هستند. فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات از طریق مهار آنزیم DAN ژیراز اعمال می‌شود (۲۴، ۲۹). گروهی از مشتقات کینولون همچون فعالیت آنزیم توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران را نیز مهار می‌کنند. اثرات ضد توموری بسیاری از داروهای ضد توموری رایج نظیر اتوپوزاید از طریق مهار فعالیت توپوایزومرازها اعمال شده که بدین ترتیب اثرات ضد توموری مشتقات کینولون نیز قابل بررسی است (۹، ۱۰، ۱۶، ۲۵). همواره یک رابطه قوی بین فعالیت کینولون و ساختمان شیمیایی آن وجود داشته است (۵، ۲۳، ۲۶). بنابر این غربال‌گری سمیت سلولی مشتقات کینولون، شناسایی ترکیبات ضد توموری جدید را ممکن می‌سازد و طراحی و ساخت ترکیبات مؤثرتر را نیز هدایت می‌کند.

فعالیت کینولون به حلقه‌های هتروآروماتیک و استخلاف‌های محیطی آن بستگی دارد. مولکول از طریق عوامل کربوکسیل و کتو مستقر در کربن‌های شماره سه و چهار و عوامل مستقر در کربن شماره شش و هفت با DNA و آنزیم توپوایزومراز درگیر می‌شود (۳، ۶). کربن شماره هفت کینولون جایگاه مناسبی برای اتصال گروه‌های طویل و پر حجم گزارش شده است (۲۶).

بررسی فعالیت ضد توموری ۹۰ مشتق کینولون در یک مدل موشی سرطان خون، ارتباط بین فعالیت ضد توموری و حضور هالوژن‌ها در کربن‌های شماره شش و هشت و گروه سیکلوپروپیل در نیتروژن شماره یک کینولون را نشان داده است (۲۸). در مطالعات دیگر، اتصال گروه ۴-هیدروکسی فیل به کربن شماره هفت در ۶-۸ دی فلوروکینولون سمیت سلولی قابل مقایسه با داروی اتوپوزاید را در پی داشته است (۲۰، ۲۱). همچنین جانشینی پیرازین کلروفنیل شده در کربن شماره هفت، سمیت سلولی قابل

توجهی به خصوص در رده‌های سلولی کارسینومای کلیه همراه داشته است (۶). Arakawa و همکارانش فعالیت ضد توموری قابل توجه مشتقات فلوروکینولون را به دنبال اتصال گروه غیر اشباع aminoazabicyclo به کربن شماره هفت در مدل موشی سرطان پستان گزارش کردند (۱).

ما اخیراً گروهی از مشتقات ۷-پیرازینیل فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و انوکساسین را به منظور شناسایی ساختمان‌های شیمیایی ضد میکروبی با روش‌های متداول ساخت این گروه از ترکیبات سنتز کرده‌ایم (۷، ۸). در مطالعه حاضر سمیت سلولی ۱۶ مشتق فلوروکینولون که در جریان مطالعات فوق سنتز شده‌اند بر شش رده سلولی بدخیم با روش MTT assay بررسی شده است.

روش بررسی

سنتزهای شیمیایی

مشتقات کینولون استفاده شده در این مطالعه بر اساس روشی که اخیراً گزارش شده است سنتز شدند (۷، ۸). ساختمان‌های شیمیایی ترکیبات استفاده شده در این تحقیق در جدول یک آورده شده است.

رده‌های سلولی و کشت سلول

رده‌های سلولی A549 (کارسینومای ریه انسان)، ACHN (کارسینومای کلیه)، SK-Mel-3 (ملانومای بدخیم انسان)، EJ (کارسینومای مثانه) و HEPG-2 (کارسینومای کبد) از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شدند. رده سلولی REFY-1 در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان از کشت بافت تومور گلیو بلاستوما مولتی فورم یک زن ۶۰ ساله در سال ۱۳۸۳ تهیه شده است. رده سلولی فوق با زمان تقسیم سلولی ۱۹ ساعت تاکنون بیش از ۱۵۰ مرتبه پاساژ شده است. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 دارای ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین کشت شدند. پاساژ کشت‌ها با محلول تریپسین-EDTA انجام شد. شمارش سلول با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی

IC50ها (غلظتی از دارو که ۵۰ رشد سلول را نسبت به کشت کنترل کاهش دهد) از طریق معادله رگرسیون غیر خطی منحنی‌های رشد سلول در برابر غلظت مشتقات محاسبه شد.

نتایج

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از نورفلوکساسین سمیت سلولی هفت مشتق کینولونی از نورفلوکساسین (مشتقات N1 تا N7) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. مشتقات N3, N2, N1 با میانگین IC50 های برابر با ۲/۹، ۲/۳ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت را بر رده‌های سلولی اعمال کردند. مشتق N4 با میانگین IC50 برابر با ۲۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر پایین‌ترین فعالیت را نشان داد. نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به این گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. رده سلولی ACHN با IC50 های برابر ۴۸، ۱۷/۳ و ۴۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین مقاومت را به ترکیبات N5, N4 و N6 نشان داد در حالی که رده سلولی REYF-1 با IC50 های بین ۱/۴ تا ۷/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین حساسیت را در برابر این گروه از ترکیبات نمایش داده است. مشتقات N5 و N6 با IC50 های برابر ۱/۴ و ۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر فعالیت معادل با اتوپوزاید بر رده‌های سلولی REYF-1 و HEPG-2 اعمال کردند. نتایج مشابهی با ترکیبات N2, N1 و N3 به دست آمد.

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از سیپروفلوکساسین

سمیت سلولی شش مشتق کینولونی از سیپروفلوکساسین (مشتقات C1 تا C6) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. مشتقات C3, C2, C1 با میانگین IC50 های برابر با ۲/۴ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بالاترین فعالیت را بر رده‌های سلولی اعمال کردند. ترکیبات C6, C5, C4 با میانگین IC50 های برابر با ۱۹/۵ تا ۲۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر پایین‌ترین فعالیت را نشان دادند. نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به این

آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین گردید که همواره بالای ۹۵٪ بود.

سنجش سمیت سلولی مشتقات کینولون

سمیت سلولی مشتقات کینولون با روش MTT assay سنجش شد (۱۷). ترکیبات کینولون در حلال DMSO حل شده و در پروت ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند. در سرتاسر این مطالعه از کشت‌های سلولی در فاز رشد و تکثیر استفاده شد. ابتدا صد میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی معادل ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت کامل به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی رقت‌های لگاریتمی دارو (۰/۳ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید. بدین ترتیب رقت نهایی بین ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید. هر رقت دارو در سه چاهک سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل به عنوان کنترل استفاده شد. مقدار DMSO محیط کشت در رقت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشتقات کینولون کمتر از ۰/۱ درصد بود. پلیت‌ها در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر شامل پنج درصد CO₂ و ۹۵ درصد هوا به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و پلیت به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستال‌های رنگ فورمازان رسوب یافته در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شد. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر و فرانس ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید. تمامی مراحل آزمون سه مرتبه تکرار شد.

آنالیز نتایج

درصد رشد و تکثیر سلول در هر رقت دارو با استفاده از رابطه زیر تعیین شد:

شدت جذب بلاک - شدت جذب در حضور دارو

درصد سلول‌های زنده = $\frac{\text{شدت جذب بلاک}}{\text{شدت جذب کنترل}} \times 100$

شدت جذب بلاک - شدت جذب کنترل

اتیل (ترکیبات N3, N2, N1, E3, E2, E1) مشاهده نشد. Robinson و همکارانش در دو مطالعه جداگانه (۲۱، ۲۰) کاهش فعالیت دی‌فلورو کینولون را از ۹ میکرومول به ۷۰ میکرومول به دنبال جایگزینی گروه سیکلوپروپیل با گروه اتیل گزارش کردند که با نتایج کسب شده در مطالعه حاضر هماهنگ نیست. اختلاف نتایج احتمالاً به دلیل متفاوت بودن استخلاف‌های محیطی حلقه‌های کینولون در مطالعه ما نسبت به مطالعه فوق است. محققین در تأیید احتمال فوق به این نکته اشاره داشته‌اند که یک موقعیت در حلقه‌های کینولون به تنهایی تعیین‌کننده فعالیت مولکول نیست و همکاری مجموعه استخلاف‌های محیطی در فعالیت مولکول نقش ایفاء می‌کنند (۲۳). تغییری در فعالیت مشتقات C3, N3, E3 به دنبال جایگزینی گروه فنیل متوکسی‌ایمینو با گروه‌های اکسیم (ترکیبات C2, N2, E2) و اکسو (ترکیبات C1, N1, E1) مشاهده نشد. مشاهدات فوق با توجه به اینکه ۵- برومو-۲- تینیل در تمامی ۹ مشتق فوق حضور دارد بر نقش کلیدی آن در فعالیت این گروه از ترکیبات تأکید می‌کند. همچنین به دنبال جایگزینی ۵- برومو-۲- تینیل (مشتقات N3 و C3) با گروه فلوروفنیل (مشتقات N4 و C4) سمیت سلولی کینولون کاهش یافت که بر اهمیت حضور بروموتینیل در فعالیت این گروه از ترکیبات تأکید می‌کند. بررسی نتایج افزایش فعالیت مشتقات C4 و N4 را به دنبال جایگزینی گروه‌های فلوروفنیل و یا فنیل‌متوکسی‌ایمینو با گروه‌های ۴،۲- دی‌فلوروفنیل و یا ۴- فلوروفنیل متوکسی‌ایمینو (مشتقات C5, C6, N5, N6, N7) نشان می‌دهد. هماهنگ با این نتایج افزایش فعالیت به دنبال حضور هالوژن‌ها در حلقه‌های کینولون گزارش شده است (۲۳).

نتایج این مطالعه حساسیت متفاوت رده‌های سلولی را به برخی از مشتقات کینولون نشان می‌دهد. به عنوان مثال، سلول‌های HEPG-2 و REYF-1 نسبت به چهار رده سلولی دیگر حساسیت بیشتری به ترکیبات N5 و N6 نشان داده‌اند. Kim و همکارانش حساسیت مجموعه‌ای از رده‌های سلولی را به گروهی از ترکیبات شیمیایی با توانایی عبور مولکول

گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. رده سلولی ACHN با IC50های بین ۳۴ تا ۵۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر مقاومت بالایی را در برابر ترکیبات C5, C4 و C6 نشان داد در حالی که رده‌های سلولی Skmel-3, HEPG-2 و A549 با IC50های کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حساسیت بالایی در برابر این گروه از ترکیبات نشان دادند. تعدادی از ترکیبات این گروه شامل C2, C1 و C3 سمیت سلولی معادل با داروی اتوپوزاید اعمال کردند.

سمیت سلولی مشتقات کینولونی از انوکساسین

سمیت سلولی سه مشتق کینولونی از انوکساسین (مشتقات E1 تا E3) بر شش رده سلولی در جدول یک نمایش داده شده است. ترکیبات این گروه با میانگین IC50های بین ۲/۵ تا ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر سمیت برابر بر رده‌های سلولی اعمال کردند. نتایج این مطالعه حساسیت یکسان رده‌های سلولی را به این گروه از ترکیبات کینولون نشان می‌دهد. همچنین این گروه از ترکیبات (مشتقات E1 تا E3) فعالیتی هم‌تراز با اتوپوزاید نشان دادند.



























بحث

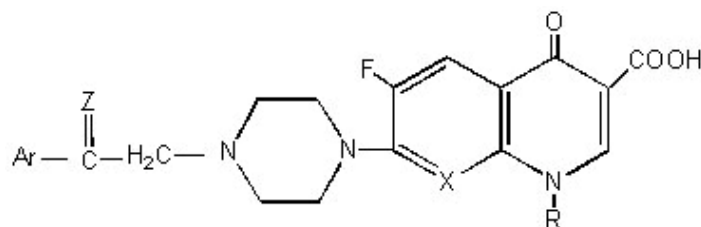
ترکیبات شیمیایی آنتی‌باکتریال فلوروکینولونی از طریق تداخل در عملکرد DNA ژیراز فعالیت می‌کنند (۲۹). شباهت‌های بسیار در مکانیسم عمل و توالی اسیدهای آمینه بین DNA ژیراز باکتری و توپوایزومراز II سلول‌های پستانداران، اثر ضد توموری این گروه از ترکیبات را مطرح می‌کند (۹، ۱۰). بنابر این در این مطالعه سمیت سلولی ۱۶ ترکیب مشتق شده از فلوروکینولون‌های سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و انوکساسین بررسی شد. بررسی نتایج وجود برخی روابط بین ساختمان و فعالیت مشتقات را آشکار می‌کند. ترکیبات N3, N2, N1 مشتق شده از نورفلوکساسین، C3, C2, C1 مشتق شده از سیپروفلوکساسین و E3, E2, E1 مشتق شده از انوکساسین، در بین مشتقات مطالعه شده بیشترین فعالیت را با کمترین میانگین‌های IC50 نشان دادند. تغییری در سمیت سلولی به دنبال جایگزینی گروه سیکلوپروپیل متصل به N1 (ترکیبات C3, C2, C1) با گروه

استخلاف در موقعیت کربن شماره هفت مرتبط است (۱۹). رده سلولی ACHN (آدنو کارسینومای کلیه انسان) بیشترین مقاومت را در برابر تعدادی از مشتقات نشان داد. هماهنگ با نتایج این مطالعه، مقاومت ذاتی سلولهای ACHN به تعدادی از داروهای ضد توموری نظیر وین کریستین و

از غشاء سلول مرتبط دانسته‌اند، به ترتیبی که مولکول‌هایی که از قابلیت نفوذ بیشتر در رده سلولی Caco-2 برخوردار بوده‌اند سمیت سلولی بالاتری را نیز عرضه کرده‌اند (۱۵). گروه دیگری از محققین بر این باورند که توانایی نفوذ مولکول کینولون به درون سلول باکتری با ماهیت

جدول ۱: هسته (ساختمان) اصلی کینولونی و ساختمان‌های مشتقات سنتز شده

Compound	Ar	Z	X	R
N1		O	C	ethyl
N2		NOH	C	ethyl
N3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	ethyl
N4		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	ethyl
N5		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	ethyl
N6		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	ethyl
N7		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	ethyl
C1		O	C	cyclopropyl
C2		NOH	C	cyclopropyl
C3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	cyclopropyl
C4		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	cyclopropyl
C5		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	cyclopropyl
C6		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	C	cyclopropyl
E1		O	N	ethyl
E2		NOH	N	ethyl
E3		$=N\cdot O\cdot CH_2$ - 	N	ethyl



به دلیل دفع کلیوی و غلظت بالا در ادرار جهت درمان بهتر تو موهرهای کلیه و مثانه مطرح شده‌اند (۲۲، ۱۲، ۴، ۲). هم‌چنین اخیراً شواهدی مبنی بر اثر سینرژیک سیپروفلوکساسین و دوکسورویسین در کشت سلول‌های بدخیم سیستم ادراری منتشر شده است (۱۱). شواهد فوق به انضمام نتایج مطالعه حاضر احتمال اثرات ضد تو موری این گروه از ترکیبات کینولون را مطرح کرده و انجام مطالعات تکمیلی با استفاده از مدل‌های مناسب حیوانات آزمایشگاهی را پیشنهاد می‌کند.

آدریامایسین گزارش شده و دلیل مقاومت بیان گلیکوپروتئین P عنوان شده است (۲۷، ۱۸، ۱۴، ۱۳). بنابر این در مطالعه حاضر احتمالاً قابلیت نفوذپذیری، تمایل به جایگاه هدف و ژنتیک سلول در فعالیت مشتقات کینولون نقش دارد.

علی‌رغم مقاومت سلول‌های ACHN نسبت به برخی از مشتقات، سلول‌های فوق همانند رده سلولی EI (کارسینوما می مثانه انسان)، حساسیت قابل توجهی به مشتقات واجد گروه بروموتینیل و N7 نشان دادند. آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون

جدول ۲: سمیت سلولی مشتقات کینولون بر شش رده سلولی بدخیم

Mean **	A549	HEPG-2	SKMEL-3	REYF-1	EJ	ACHN	رده سلولی ترکیب
۲/۹	۳/۲	۲/۶	۳/۲	۲/۸	۲/۸	۲/۹ *	N1
۲/۳	۲/۵	۱/۷	۲/۶	۲/۶	۱/۸	۲/۶	N2
۲/۵	۲/۱	۲/۷	۲/۷	۲/۴	۲/۶	۲/۷	N3
۲۶/۲	۱۳/۲	۲۰/۷	۳۵/۸	۷/۷	۳۱/۸	۴۸	N4
۶/۲	۶/۲	۱/۶	۴/۳	۱/۴	۶/۵	۱۷/۳	N5
۱۲/۶	۸	۱/۴	۷	۱/۴	۱۷/۸	۴۰/۵	N6
۴/۴	۵/۷	۲/۷	۷	۴	۴/۷	۲/۴	N7
۳	۲/۴	۲/۹	۳/۵	۳/۳	۳/۱	۳/۵	C1
۲/۴	۲/۸	۱/۷	۲/۵	۲/۵	۲/۶	۲/۴	C2
۲/۹	۲/۵	۳/۱	۳/۵	۲/۷	۲/۹	۲/۸	C3
۳۵/۶	۳۶	۲۴/۶	۳۳/۶	۲۵/۸	۴۵/۶	۴۸/۴	C4
۲۱/۵	۸/۶	۱۵/۹	۶	۲۳	۱۹/۶	۵۶/۲	C5
۱۱/۵	۴/۴	۳/۸	۶	۱۰/۷	۱۰/۲	۳۴	C6
۳	۲/۷	۲/۵	۲/۵	۳/۱	۳/۲	۳/۸	E1
۲/۵	۱/۴	۲/۸	۳/۳	۲/۵	۲/۷	۲/۶	E2
۲/۹	۲/۶	۲/۵	۳/۶	۳/۴	۲/۸	۲/۸	E3
۱/۷	۱/۷	۲/۱	۱/۸	۱/۶	۱/۶	۱/۸	Etoposide

سلول‌ها به مدت سه روز با رقت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیبات کینولون مجاور شدند، سپس فعالیت متابولیسی سلول با روش MTT assay سنجش شد.
* = غلظت کینولون (میکروگرم در میلی‌لیتر) که رشد سلول را ۵۰ درصد نسبت به کنترل کاهش می‌دهد.
** = میانگین IC50های شش رده سلولی مربوط به هر مشتق کینولون

تشکر و قدردانی

پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان است. لذا بدین وسیله از آن معاونت تشکر می‌شود.

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی شماره ۸۴/۳۶ مصوب معاونت

Summary

In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Sixteen New N-Piperazinyl Quinolone Derivatives Against A Panel Of Tumor Cell Lines

Rajabalian S., MSc.¹, Foroumadi A.R., Ph.D.², Heidari M.R. Ph.D.³, Karimzadeh R., Pharm.D.⁴, Pardakhti A., Ph.D.⁵, Hosseini R., B.Sc.¹

1. Researcher, Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. Associate Professor of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 3. Professor of Pharmacology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 4. Pharmacist 5. Assistant Professor of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Technology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Introduction: Fluoroquinolones are potent inhibitors of bacterial topoisomerase II. They can also inhibit eukaryotic topoisomerase, and may confer antitumoral properties.

Method: In this study the antitumoral activity of a new series of N-substituted piperazinyl-fluoroquinolones against a panel of human tumor cell lines was determined by MTT assays.

Results: Among the tested compounds N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-oxoethyl] (C1,N1,E1), N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-(hydroxyimino) ethyl] (C2,N2,E2) and N-[2-(5-bromo-2-thienyl)-2-(phenylmethoxyimino) ethyl] (C3,N3,E3) piperazinyl quinolones exhibited the most cytotoxic activities (mean IC50s = 2.5 to 3 µg/ml), comparable to that of the Etoposide (mean IC50= 1.7µg/ml). Replacement of the 5-bromo-2-thienyl with 4-fluorophenyl or 2,6-difluorophenyl rings leads to variable inhibition activity. The quinolone activity was enhanced by the presence of a chlorine and two fluorine atoms at the benzyl and phenyl groups, especially against ACHN renal adenocarcinoma cell line.

Conclusion: These data suggest that these series of quinolones provide good models for the further design of potent antitumor compounds.

Key words: Cytotoxicity, Fluoroquinolone, MTT- assay, Etoposide

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 100-108.

References

1. Arakawa H, Mano E, Hakoda N, Yoshinari T, Nakagawa S, Okura A. Potent antitumor activity of quinolone compounds with an unsaturated aminoazabicyclo group at the C-7 position of the quinolone ring. *Anticancer Drug Des* 1996; 11(3): 221-9.
2. Aranha O, Wood DP Jr, Sarkar FH. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 891-900.
3. Domagala JM, Hanna LD, Heifetz CL, Hutt MP, Mich TF, Sanchez JP, Solomon M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target

- enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J Med Chem* 1986; 29(3): 394-404.
4. Ebisuno S, Inagaki T, Kohjimoto Y, Ohkawa T. The cytotoxic effect of floxacine and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma *in vitro*. *Cancer* 1997; 80(12): 2263-7.
 5. Elsea SH, McGuirk PR, Gootz TD, Moynihan M, Osheroff N. Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage *in vitro* and cytotoxic potential. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(10): 2179-86.
 6. Fang KC, Chen YL, Sheu JY, Wang TC, Tzeng CC. Synthesis, antibacterial, and cytotoxic evaluation of certain 7-substituted norfloxacin derivatives. *J Med Chem* 2000; 43(20): 3809-12.
 7. Foroumadi A, Soltani F, Mirzaei M. Antituberculosis agents IV: *in vitro* antimycobacterial activity and cytotoxicity of N-piperazinyl quinolone derivatives containing 2-thienyl and 2-furyl moiety. *Pharmazie* 2003; 58(5): 347-8.
 8. Foroumadi A, Soltani F, Asadipour A. Antituberculosis agents. VII. Synthesis and *in vitro* evaluation of antimycobacterial activity and cytotoxicity of some N-piperazinyl quinolone derivatives. *Boll Chim Farm* 2003; 142(3): 130-4.
 9. Gootz TD, Barrett JF, Sutcliffe JA. Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on eukaryotic topoisomerases and related test systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(1): 8-12.
 10. Hussy P, Maass B, Tummler B, Grosse F, Schomburg U. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29(6): 1073-1078.
 11. Kamat AM, DeHaven JI, Lamm DL. Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer. *Urology* 1999; 54(1): 56-61.
 12. Kamat AM, Lamm DL. Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology* 2004; 63(3): 457-60.
 13. Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, Yamada S, Okano M, Kawada Y. Detection of low-level expression of P-glycoprotein in ACHN renal adenocarcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(5): 475-9.
 14. Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, Yamada S, Okano M, Kawada Y. Correlation of expression levels of P-glycoprotein with resistance to adriamycin in a renal adenocarcinoma cell line. *Urol Res* 1997; 25(6): 407-12.
 15. Kim JS, Rhee HK, Park HJ, Lee IK, Lee SK, Suh ME, Lee HJ, Ryu CK and Choo HY. Synthesis of 6-chloroisoquinoline-5,8-diones and pyrido[3,4-*b*]phenazine-5,12-diones and evaluation of their cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory activity. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(1): 451-7.
 16. Liu L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 351-75.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
 18. Nygren P, Larsson R. Differential *in vitro* sensitivity of human tumor and normal cells to chemotherapeutic agents and resistance modulators. *Int J Cancer* 1991; 48(4): 598-604.
 19. Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 3:S180-6.
 20. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan M, Sutcliffe JA, Osheroff N. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-

- mediated DNA cleavage. *J Biol Chem* 1991; 266(22): 14585-92.
21. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuiirk PR, Osheroff N. Effects of novel fluoroquinolones on the catalytic activities of eukaryotic topoisomerase II: Influence of the C-8 fluorine group. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36(4): 751-6.
 22. Seay TM, Peretsman SJ, Dixon PS. Inhibition of human transitional cell carcinoma *in vitro* proliferation by fluoroquinolone antibiotics. *J Urol* 1996; 155(2): 757-62.
 23. Suto MJ, Domagala JM, Roland GE, Mailloux GB, Cohen MA. Fluoroquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity. *J Med Chem* 1992; 35(25): 4745-50.
 24. Vosberg H.D. DNA topoisomerase: enzymes that control DNA conformations. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985, 114: 19-102.
 25. Wentland MP, Leshner GY, Reuman M, Gruett MD, Singh B, Aldous SC, et al. Mammalian topoisomerase II inhibitory activity of 1-cyclopropyl -6,8-difluoro -1,4-dihydro-7-(2,6-dimethyl-4-pyridinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid and related derivatives. *J Med Chem* 1993; 36(10): 2801-9.
 26. Xia Y, Yang ZY, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the discovery and development of quinolones and analogs as antitumor agents. *Curr Med Chem* 1999; 6(3): 179-94.
 27. Yu DS, Chang SY, Ma CP. The expression of *mdr-1*-related *gp-170* and its correlation with anthracycline resistance in renal cell carcinoma cell lines and multidrug-resistant sublines. *Br J Urol* 1998; 82(4): 544-7.
 28. Yamashita Y, Ashizawa T, Morimoto M, Hosomi J, Nakano H. Antitumor quinolones with mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage activity. *Cancer Res* 1992; 52(10): 2818-22.
 29. Zweerink MM, Edison A. Inhibition of *Micrococcus luteus* DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29(4): 598-601

بررسی صحت تشخیص بالینی در رفتگی غیر قابل بازگشت دیسک در مفصل گیجگاهی فکی توسط MRI

دکتر ماهرخ ایمانی مقدم^{۱*}، دکتر اعظم السادات مدنی^۲، دکتر مریم گودرزی^۱، دکتر سیروس نکویی^۲، مهندس سعید ابراهیم زاده^۲

خلاصه

هدف: اختلال داخلی مفصل گیجگاهی فکی پس از اختلالات عضلانی شایع‌ترین اختلالات مفصل هستند و شامل کلیه بیماری‌های مربوط به عدم هماهنگی و جا به جایی دیسک و کندیل می‌باشند. در صورت جا به جایی شدید دیسک یا کندیل و مجوس شدن دیسک در جلو کندیل که با کاهش میزان باز شدن دهان همراه است، در رفتگی غیر قابل بازگشت دیسک یا قفل شدن در حالت دهان بسته (closed lock) اتفاق می‌افتد. هدف از این مطالعه ارزیابی اعتبار معیارهای کلینیکی در تشخیص جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک مفصل گیجگاهی-فکی با کمک MRI به عنوان Gold standard است.

روش: در این مطالعه ۱۰ نفر از بیماران با علائم اختلالات مفصل گیجگاهی فکی مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی مشهد که در معاینه کلینیکی تشخیص جا به جایی بدون بازگشت دیسک یا قفل شدن در وضعیت دهان بسته برای آنها گذاشته شد انتخاب شدند. تصاویر MRI در مقاطع ساژیتال و کروئال جهت تعیین موقعیت دقیق دیسک و کندیل تهیه شد. برای تعیین اعتبار معیارهای کلینیکی در تشخیص جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک از ارزش اخباری مثبت، ضریب توافق Kappa و حساسیت استفاده شد.

یافته‌ها: توافق کلی بین معاینات کلینیکی با یافته‌های MRI در این مطالعه ۰/۲۲ بدست آمد. میزان حساسیت و ارزش اخباری مثبت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۲۰٪ محاسبه شد. نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که معیارهای کلینیکی معمول برای تشخیص بیماران مبتلا به Closed lock ارزش کافی نداشته و در بیماران با تشخیص کلینیکی قفل شدن در حالت دهان بسته، نیاز به اطلاعات تکمیلی با استفاده از MRI برای تعیین دقیق موقعیت دیسک و کندیل می‌باشد. واژه‌های کلیدی: تصویر برداری با استفاده از میدان مغناطیسی (MRI)، مفصل گیجگاهی فکی، در رفتگی غیر قابل بازگشت دیسک، تشخیص بالینی

۱- استادیار بخش رادیولوژی فک و صورت و عضو مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد ۲-دانشیار بخش پروتزهای دندانی و عضو مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد ۳- استادیار بخش رادیولوژی، بیمارستان قائم مشهد ۴- مربی آمار حیاتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد

* نویسنده مسؤول: بخش رادیولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد • آدرس پست الکترونیک: imananim@mums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۱۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۹ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۱۹

مقدمه

اختلالات گیجگاهی - فکی یکی از اختلالات شایع در جوامع بشری امروز است و به سه زیر گروه اختلالات عضلانی، اختلالات داخلی و بیماری‌های دژنراتیو مفصل تقسیم می‌شوند (۱). اختلالات داخلی جزو اختلالات سدکننده فعالیت دیسک بوده و شامل کلیه بیماری‌های مربوط به عدم هماهنگی دیسک و کندیل و قفل شدن فک و جا به جایی دیسک و کندیل است (۴). برای تأیید این که این اختلالات ماهیت‌های جداگانه‌ای دارند یا خیر اطلاعات کمکی (پارا کلینیکی) لازم است (۲). آرتروگرافی و تکنیک‌های جدید تصویربرداری مانند MRI و CT-SCAN و سونوگرافی شناخت بهتر آناتومی و تشخیص اختلالات داخلی را فراهم کرده‌اند (۴). بعلاوه در مطالعات زیادی از MRI به عنوان Gold standard در تعیین موقعیت دیسک و کندیل استفاده شده است (۳، ۱۰، ۱۲، ۱۳).

Yatani و همکارانش پیشنهاد کردند که جا به جایی قدامی همراه با بازگشت دیسک می‌تواند تا حدودی با معاینه کلینیکی به تنهایی تشخیص داده شود. آنها همچنین در مطالعه‌ای دیگر عنوان کردند که تمایز بین جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک از دیگر تشخیص‌ها مشکل است و بیماران دارای علائم کلینیکی گیج کننده‌ای هستند که تشخیص را دچار مشکل می‌کند (۱۵).

Tasaki در سال ۱۹۹۳ دقت تشخیصی MRI در مقایسه با نمونه‌های اتوپسی مفصل گیجگاهی - فکی را بررسی کرد. در این مطالعه مشخص شد که دقت MRI در تعیین موقعیت و شکل دیسک ۹۵٪ و برای تعیین شرایط استخوانی ۹۳٪ است (۱۱). که با نتایج سایر محققان تفاوت دارد. به عنوان مثال Raustia و همکاران یافته‌های MRI را در بیماران حین جراحی مقایسه کردند که موقعیت دیسک در ۸۸٪ موارد درست تشخیص داده شده بود. آنها هم چنین ارتباط بین تشخیص بالینی و یافته‌های حین جراحی را مقایسه کردند. در ۷۵٪-۸۹٪ موارد تشخیص بالینی جابه‌جایی قدامی دیسک، حین جراحی تأیید شد. ولی این محققان جزئیات کار را توضیح نداده‌اند (۹).

Paesani و همکاران (۱۹۹۲) دقت معاینه کلینیکی را در تعیین اختلالات داخلی مفصل و آرتروز با استفاده از آرتروگرافی دو طرفه و یا MRI بررسی کردند. در ۴۳٪ از بیماران تشخیص بالینی با تصاویر MRI منطبق بود که درصد بسیار کمی بوده و ۵۷٪ موارد تشخیص داده نشده بودند. بر اساس معاینه کلینیکی در ۵۵ مفصل اختلالات داخلی (Internal derangement) تشخیص داده شد اما مکان دقیق دیسک و مرحله اختلال داخلی با معاینه کلینیکی تشخیص داده نشد (۸).

از آنجایی که تکنیک‌های تصویربرداری جدید مفصل گیجگاهی فکی از جمله MRI صرف نظر از موارد عدم درخواست آن غالباً هزینه‌های نسبتاً بالایی نیز دارند، این مطالعه با هدف بررسی صحت تشخیص کلینیکی در رفتگی غیر قابل بازگشت دیسک مفصل گیجگاهی-فکی در مقایسه با MRI به عنوان Gold standard انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مقطعی (Cross sectional) بوده و گروه مورد مطالعه شامل ۱۰ نفر از بیماران مبتلا به اختلالات مفصل گیجگاهی- فکی مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی مشهد بودند.

همه بیماران توسط متخصص پروتز معاینه شدند. این بیماران در طبقه‌بندی انگل دارای اکلوژن CLI و ساپورت دندان‌های خلفی بودند و در مراجعه علائم زیر را داشتند:

۱- محدودیت در باز کردن دهان که بطور ناگهانی بروز کرده است (حداکثر ۳-۲/۵ سانتی‌متر).

۲- محدودیت در حرکات طرفی فک

۳- سابقه click

۴- احساس سختی انتهایی مثبت (hard end feel) که برای انجام این تست، در حالت دهان باز با انگشتان دست روی دندان‌های قدامی پائین بیمار فشار وارد می‌کنیم اگر بعد از چند ثانیه میزان حداکثر باز شدن دهان افزایش پیدا نکند تست احساس سختی انتهایی مثبت است.

معیارهای خروج از مطالعه شامل: ۱- اسپاسم و گرفتگی

سانتی متر و برای تصاویر ساژیتال ۱۶-۱۲ سانتی متر و زمان لازم برای گرفتن هر سری تصویر ۴/۵ دقیقه بود. تصاویر توسط یک رادیولوژیست دهان و فک و صورت و یک رادیولوژیست متخصص MRI بررسی شده و بر اساس معیارهای Westesson تفسیر شد (۱۴).

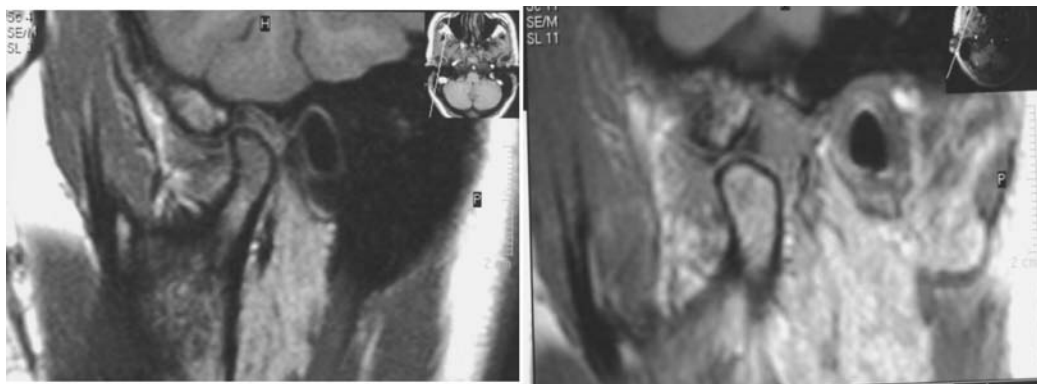
در پلن ساژیتال، اگر باند خلفی دیسک در موقعیت دهان بسته قدامی تر از حالت ساعت ۱۲ نسبت به سر کندیل قرار گیرد، جا به جایی قدامی در نظر گرفته می شود. اگر در حالت دهان باز در همین پلن دیسک به موقعیت نرمال خود باز گردد، جا به جایی قدامی همراه با بازگشت و اگر دیسک در حالت دهان باز در قدام کندیل و برجستگی مفصلی باقی بماند جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک در نظر گرفته می شود (شکل ۳ و ۱) و اگر در نمای فرونتال دیسک از قطب داخلی یا خارجی کندیل فراتر رفته باشد به ترتیب به عنوان جا به جایی مدیالی یا لترالی در نظر گرفته می شود (۱۴).

برای تعیین میزان جا به جایی قدامی دیسک از روش Ogutcen-Toller و همکاران استفاده شد، در این روش در پلن ساژیتال خطی مماس بر تحتانی ترین قسمت توبرکل خلفی مفصل و برجستگی مفصلی کشیده شد. زاویه بین خط عمود بر میانه قسمت کندیلار این خط و خط مماس بر باند خلفی دیسک اندازه گیری شده و بر اساس جدول ۱ میزان جا به جایی قدامی دیسک تعریف شد (۷) (جدول ۱ و شکل ۴).

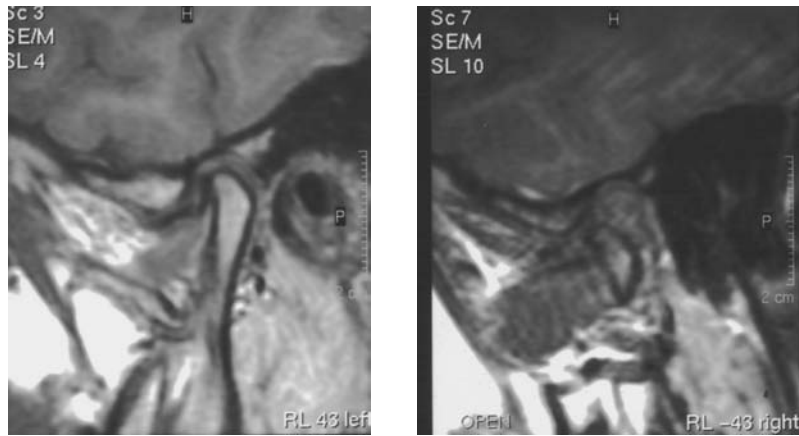
عضلات ۲- بیماری های سیستمیک مثل اسکرودرمی یا روماتوئید آرتریت ۳- سابقه ترومای حاد ۴- وجود روکش های حاوی ترکیبات آهن و کبالت در دهان بیمار ۵- سه ماهه اول بارداری ۶- وجود pacemaker قلبی و ۷- ترس از قرار گرفتن در محیط بسته (clusterphobia) بود.

تشخیص کلینیکی جا به جایی بدون بازگشت دیسک یا قفل شدن در حالت دهان بسته (closed lock) بر اساس معیارهای Okason برای بیماران مورد معاینه گذاشته شد (۶). در این تحقیق برای بررسی صحت تشخیص کلینیکی بیماران مبتلا به closed lock از MRI به عنوان Gold standard در تعیین موقعیت دیسک استفاده شد. برای انجام تصویربرداری MRI از تمام بیماران رضایت نامه کتبی گرفته شد. همه تصاویر MRI با دستگاه MRI (signa contour) ۰/۵ تسلا و حلقه سطحی مخصوص مفصل گیجگاهی-فکی تهیه گردید.

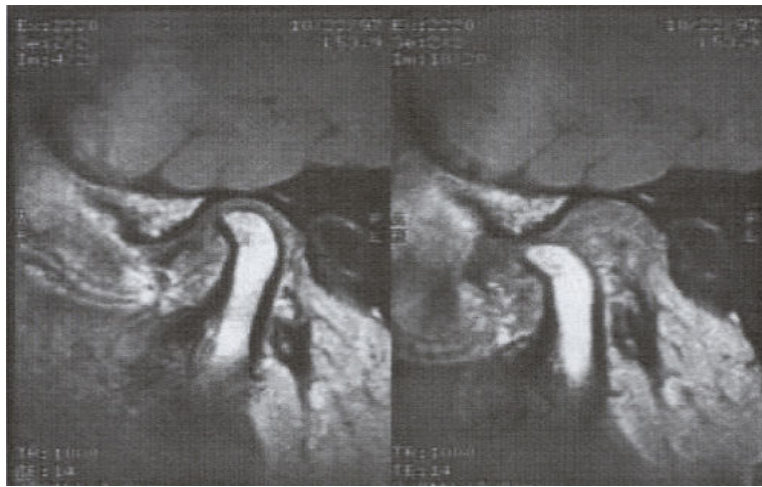
هنگام تصویربرداری بیماران در حالت خوابیده قرار گرفته و تصاویر در مقاطع ساژیتال و کرونال در حالت دهان بسته و در مقطع ساژیتال در حالت دهان کاملاً باز گرفته شد. برای باز نگه داشتن دهان بیمار از اندکس پوتی استفاده شد، در تصویربرداری بیماران از تصاویر T_1 با $T_E=17$ و $T_R=500$ و تصاویر T_2 با $T_E=90$ و $T_R=3000$ استفاده شد. ضخامت هر برش برای هر سری تصاویر ۳ میلی متر بدون هیچ فاصله ای بین آنها بود که در نهایت ۱۲-۱۱ تصویر در هر سری تهیه شد. میدان دید برای تصاویر کرونال ۱۲



شکل ۱: وضعیت طبیعی



شکل ۲: جابجایی قدامی با بازگشت دیسک



شکل ۳: جابجایی قدامی بدون بازگشت دیسک



شکل ۴: روش تعیین میزان جابجایی دیسک

جدول ۱: تعیین میزان جا به جایی دیسک با استفاده از روش Ogutcen-Toller

موقعیت دیسک	زاویه
موقعیت نرمال دیسک	۱۰-۰
جا به جایی قدامی جزئی (slight)	۱۱-۳۰
جا به جایی قدامی خفیف (mild)	۳۱-۵۰
جا به جایی قدامی متوسط (moderate)	۵۱-۸۰
جا به جایی قدامی شدید (severe)	بیشتر از ۸۰

نظر کلینیکی جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک تشخیص داده شد که فقط در ۲ مفصل تشخیص کلینیکی توسط MRI تأیید شد. در ۲ مفصل (یک بیمار) موقعیت دیسک در تصاویر MRI در حالت نرمال قرار داشت و در ۲ مفصل دیگر (یک بیمار) موقعیت دیسک قابل تشخیص نبود. در ۶ مفصل باقیمانده در تصاویر MRI جا به جایی قدامی با بازگشت دیسک و در تصاویر کرونال تنها در یک مفصل جا به جایی مدیالی مشاهده شد و در بقیه مفاصل جا به جایی داخلی یا خارجی مشاهده نشد.

آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان جا به جایی قدامی دیسک و حداکثر میزان باز شدن دهان وجود دارد ($P=0/031$) ولی چون تعداد نمونه‌ها در گروه‌های مورد نظر به حد کفایت نرسید این نتیجه دارای اعتبار لازم نبود (جدول ۲). همچنین ارتباط معنی داری بین میزان حرکت کندیل و میزان جا به جایی دیسک مشاهده نشد.

میزان حساسیت و ارزش اخباری مثبت برای تشخیص کلینیکی در مقایسه با MRI به ترتیب ۱۰۰٪ و ۲۰٪ محاسبه شد. مقدار ضریب توافق Kappa ۰/۲۲ بدست آمد.

برای بیان توافق بین تشخیص کلینیکی و تشخیص MRI از ضریب توافق کاپا، ارزش اخباری مثبت و حساسیت استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین میزان جا به جایی قدامی دیسک و حداکثر میزان باز شدن دهان از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد.

نتایج

محدوده سنی بیماران مورد مطالعه ۱۹-۵۹ سال با میانگین سنی ۳۱/۵ سال بود. میزان حداکثر باز شدن دهان در این بیماران ۳۰-۱۵ میلی‌متر با میانگین ۲۲/۴ میلی‌متر بود. از ۲۰ مفصل معاینه شده (۱۰ بیمار) برای ۱۲ مفصل از

جدول ۲: میانگین، انحراف معیار و واریانس میزان جا به جایی قدامی دیسک و حداکثر باز شدن دهان

تعداد مفصل	واریانس	انحراف معیار	میانگین (میلی‌متر)	MMO ^۱ میزان جابجایی قدامی دیسک
۲	۱۲/۵	۳/۵	۱۷/۵	جزئی (Slight)
۱	۰	۰	۲۵	خفیف (Mild)
۳	۱۶/۳	۴	۲۲	متوسط (Moderate)
۲	۸	۲/۸	۲۸	شدید (Severe)
۲	۰	۰	۲۵	نرمال

MMO^۱: Maximum mouth opening

بحث

در این مطالعه از معیارهای کلینیکی معمول در تقسیم‌بندی اختلالات مفصل گیجگاهی - فکی استفاده شد و مشخص گردید که هماهنگی ضعیفی بین تشخیص کلینیکی و یافته‌های MRI وجود دارد.

در مطالعه حاضر ارزش اخباری ۲۰٪ بدست آمد، در حالی که در هیچ مطالعه دیگری ارزش اخباری برای تشخیص کلینیکی بیماران Closed lock محاسبه نشده است. Barclay و همکاران در سال ۱۹۹۹ ارزش اخباری مثبت را برای پروسه تشخیص کلینیکی (Research diagnostic criteria for temporomandibular disorder condition)

برای بیماران با تشخیص جا به جایی دیسک همراه با بازگشت ۰/۶۵ تعیین کردند (۱). در مطالعه Emshoff و همکاران (۲۰۰۲) در مقایسه بین تشخیص کلینیکی و MRI در جا به جایی قدامی همراه با بازگشت دیسک ارزش اخباری مثبت ۰/۴۴ تعیین شد (۴).

در مطالعه Brandlmaier و همکاران (۲۰۰۳) برای تعیین اعتبار معیارهای کلینیکی در تشخیص بیماری‌های دژنراتیو مفصل ارزش اخباری مثبت ۰/۶۷ محاسبه شد. در مطالعه مذکور استنوا ترتیب با عنوان بیماری دژنراتیو مفصل در نظر گرفته شده است (۲).

در مطالعه Lemke و همکاران (۲۰۰۵) مشخص شد با افزایش شدت اختلالات داخلی میزان حرکت کندیل از حالت مرکزی به خارج مرکزی افزایش می‌یابد (۵).

در حالی که در مطالعه حاضر بین میزان حرکت کندیل در حفره مفصلی هنگام باز شدن دهان و میزان جا به جایی قدامی دیسک ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. ممکن است

این تفاوت به دلیل محدود بودن تعداد نمونه‌های مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه حاضر میزان حساسیت معاینه کلینیکی ۱۰۰٪ محاسبه شد. در مطالعات دیگر میزان حساسیت معاینات کلینیکی برای تشخیص جا به جایی بدون بازگشت دیسک اندازه‌گیری نشده است. توافق بین تشخیص کلینیکی و MRI در مطالعه Barclay و همکاران در بررسی صحت دقت RDC/TMD ۰/۳۶ اعلام شد (۱). در مطالعه Brandlmaier ضریب توافق Kappa برای بررسی صحت تشخیص کلینیکی در بیماری‌های دژنراتیو مفصل ۰/۰۱ بدست آمد (۲).

ضریب توافق Kappa برای جا به جایی قدامی بدون بازگشت دیسک در مطالعات دیگر محاسبه نشده است. در مطالعه حاضر مقدار ضریب توافق Kappa ۰/۲۲ بدست آمد و توافق ضعیف بین تشخیص کلینیکی و تشخیص MRI به علت تعداد بالای تشخیص‌های مثبت کاذب در معاینه کلینیکی بود.

نتیجه‌گیری

برای تشخیص موقعیت دیسک و کندیل حضور معیارهای کلینیکی به تنهایی کافی نمی‌باشد. بنابر این برای کسب اطلاعات دقیق از موقعیت دیسک علاوه بر معاینه کلینیکی تکنیک‌های تصویربرداری که دقیق‌ترین آنها در تعیین موقعیت دیسک MRI می‌باشد نیز لازم می‌باشند.

سپاسگزاری

با تقدیر و تشکر فراوان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که هزینه این پژوهش را تأمین نمودند.

Summary

Accuracy Rate of Clinical Diagnosis of Disc Displacement without Reduction in Temporomandibular Joint Using MRI

Imani Moghadam M., DDS.,MS¹., Madani AS., DDS.,MS²., Goodarzi M., DDS.,MS¹ ., Nekoie S., M.D.³, Ebrahaimzadeh S., M.Sc.⁴

1. Assitant Professor of Oral and Maxillofacial Radiolog, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences and Health Services, Mashhad, Iran. 2. Assocate Professor of Prosthodontics, School of Dentistry, Mashhad University of Medical Sciences and Health Services, Mashhad, Iran. 3. Assitant Professor of Radiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences and Health Services, Mashhad, Iran. 4. Instructor of Biostatistics, Mashhad University of Medical Sciences and Health Services, Mashhad, Iran.

Introduction: Internal derangement (ID) of TMJ is the most common type of temporomandibular disorders after muscle disorders and includes all disorders related to incoordination and dislocation of disc and condyle. Anterior disc displacement without reduction or closed lock will happen if the disc or condyle displaces severely or if the disc traps in the space in front of the condyle accompanied with reduction in maximum mouth Opening. The purpose of this study was to evaluate reliability of clinical diagnosis of disc displacement without reduction (closed lock) by using magnetic resonance imaging as the Gold standard.

Method: This cross-sectional study was carried out on 10 patients who had referred to Dental school of Mashhad University with the symptoms of ID and were assigned a clinical diagnosis of disc displacement without reduction. Sagital and coronal MR images were obtained with 0.5 Tesla magnetic resonance system, with the jaw in closed and maximum opening position subsequently to establish the corresponding diagnosis of disc-condyle relationship. The data analysis included kappa statistic and calculation of positive predictive values and sensitivity.

Results: The overall diagnostic agreement for disc displacement without reduction was 0.22 with a corresponding kappa value. The predictive value for clinical diagnosis of disc displacement without reduction was 20% and the sensitivity was 100%.

Conclusion: According to the results, clinical diagnostic criteria for disc displacement without reduction is not reliable and patients assigned clinical TMJ-related diagnosis of disc displacement without redaction may need to be supplemented by evidence from MRI to determine the functional disc – condyle relationship.

Key Words: MRI, TMJ, Anterior disc displacement without reduction, Clinical diagnosis

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 109-116

References

1. Barclay P, Hollender LG, Maravilla KR, Truelove EL. Comparison of clinical and magnetic resonance imaging diagnosis in patients with disc displacement in the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88(1): 37-43.
2. Brandlmaier I, Gruner S, Rudisch A, Bertram S, Emshoff R. Validation of the clinical diagnostic criteria for temporomandibular disorders for the diagnostic subgroup of degenerative joint disease. *J Oral Rehabil* 2003; 30(4): 401-6.
3. Emshoff R, Brandlmaier I, Bertram S, Rudisch A. Risk factors for temporomandibular joint pain in patients with disc displacement without reduction –a magnetic resonance imaging study. *J Oral Rehabil* 2003; 30(5): 537-43.

4. Emshoff R, Brandlmaier I, Bosch R, Gerhard S, Rudisch A, Bertram S. Validation of the clinical diagnostic criteria for temporomandibular disorders for the diagnostic subgroup disc displacement with reduction. *J Oral Rehabil* 2002; 29(12): 1139-45.
5. Lemke AJ, Griethe M, peroz I, Lange KP, Felix R. Morphometric analysis of TMJ with MRI in 320 joints. *Rofo* 2005; 177(2): 217-28.
6. Okason J: Management of temporomandibular disorders and occlusion. 3rd ed., Mosby, 1993; PP178-226.
7. Ogutcen-Toller M, Taskaya-Yilmaz N, Yilmaz F. The evaluation of temporomandibular joint disc position in TMJ disorders using MRI. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(6): 603-7.
8. Paesani D, Westesson PL, Hatala MP, Tallents RH, Brooks SL. Accuracy of clinical diagnosis for TMJ internal derangement and arthrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73(3): 360-3.
9. Raustia AM, Pyhtinen J, Pernu H. Clinical, magnetic - resonance imaging and surgical findings in patients with temporomandibular joint disorder: a survey of 47 patients. *Rofo* 1994; 160(5): 406-11.
10. Simmons HC, Gibbs SJ. Anterior repositioning appliance therapy for TMJ disorders: specific symptoms relieved and relationship to disc status on MRI. *Cranio* 2005; 23(2): 88-99.
11. Tasaki MM. Magnetic resonance imaging and arthrographic assessment of temporomandibular joint disc displacement- (thesis) University of Uema, Umea, Sweden, 1993.
12. Tognini F, Manfredini D, Melchiorre D, Zampa V, Bosco M. Ultrasonographic vs MRI findings of temporomandibular joint effusion. *Minerva stomatol* 2003; 52(7-8): 365-70.
13. Usumez S, Oz F, Guray E. Comparison of clinical and magnetic resonance imaging diagnoses in patients with TMD history. *J Oral Rehabil* 2004; 31(1): 52-6.
14. Westesson PL, Karzberg RW, Tallents RH, Sanchez-Woodworth RE, Svensson SA, Espeland MA. Temporomandibular joint: comparison of MR images with cryosectional anatomy. *Radiology* 1987; 164(1): 59-64.
15. Yatani H, Sonoyama W, Kuboki K, Matsuka Y, Orsini MG, Yamashita A. The validity of clinical examination for diagnosing anterior disc displacement with reduction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6): 647-53.

بررسی سطح هموسیستئین پلاسما در بیماران همودیالیزی شهر کرمان در سال ۱۳۸۴

دکتر سیده مجتبی سهروردی^{*}، دکتر جلال آزمندیان^۱، دکتر فریدون دریایی^۲، دکتر امیر هوشنگ محمدپور^۳ و دکتر میترا مهربانی^۴

خلاصه

مقدمه: هموسیستئین اسید آمینه‌ای است که در مسیر متابولیسم متیونین به سیستئین تشکیل می‌شود. محدوده طبیعی هموسیستئین پلاسما در انسان $5-15 \mu\text{mol/L}$ است. افزایش غلظت هموسیستئین به میزان $5 \mu\text{mol/L}$ بیش از حد طبیعی، سبب افزایش خطر بیماری‌های قلبی - عروقی، آترواسکلروز و ترومبوز می‌شود. از طرف دیگر در بیماران همودیالیزی بنابه دلایلی چون اورمی، فاکتورهای ژنتیکی، عوامل وابسته به دیالیز و کاهش ویتامین‌های گروه B، سطح پلاسمایی هموسیستئین بالا می‌رود. این مطالعه به منظور بررسی سطح پلاسمایی هموسیستئین، ویتامین B12 و اسید فولیک در بیماران همودیالیزی شهر کرمان و مقایسه آن با افراد سالم انجام شد.

روش: از ۲۵ بیمار همودیالیزی مراجعه کننده به ۲ مرکز دیالیز شهر کرمان و ۲۵ فرد سالم نمونه پلاسمایی جهت تعیین مقدار هموسیستئین، ویتامین B12 و اسید فولیک گرفته شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای 20°C - نگهداری شدند. آنالیز هموسیستئین با دستگاه گاز- کروماتوگرافی و آنالیز ویتامین‌ها به روش رادیوایمنواسی انجام شد. یافته‌ها: در گروه بیماران با میانگین سنی $53/3 \pm 13/5$ ، میانگین مقدار هموسیستئین برابر $19/7 \pm 8/8$ بود که با میانگین هموسیستئین افراد سالم ($3/3 \pm 1/5$) تفاوت معنی دار داشت ($P=0/024$). مدت زمانی که از شروع دیالیز بیمار می‌گذشت و نیز سن بیماران تأثیری در مقدار هموسیستئین آنها نداشت. سطح سرمی ویتامین B12 و فولیک اسید در گروه بیمار به ترتیب عبارت بودند از: $4672 \pm 2379 \text{ pmol/L}$ و $47 \pm 17 \text{ nmol/L}$. این مقادیر در جمعیت سالم به ترتیب برابر $959 \pm 409 \text{ pmol/L}$ و $14 \pm 12 \text{ nmol/L}$ بودند.

نتیجه‌گیری: هرچند میانگین هموسیستئین در بیماران دیالیزی نسبت به افراد سالم بالاتر بود ولی به مقدار فاحشی در مقایسه با میانگین سطح هموسیستئین در بیماران همودیالیزی جوامع دیگر کمتر بود. به نظر می‌رسد که این اختلاف به عوامل مختلفی از جمله مصرف آمپول‌های ویتامین B12 و B Complex بعد از هر بار دیالیز به صورت وریدی و تجویز اسید فولیک خوراکی در این بیماران بستگی داشته باشد. بنابراین توصیه می‌شود این روند ادامه یابد.

واژه‌های کلیدی: هموسیستئین، همودیالیز، ویتامین B12، اسید فولیک

۱- استادیار گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- استادیار گروه نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۳- استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۴- استادیار گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد ۵- استادیار گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

* نویسنده مسؤول: گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: smsohrevardi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۵/۲۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۱/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۲

مقدمه

هموسیستین اسید آمینه‌ای است که در مسیر متابولیسم متیونین به سیستین تشکیل می‌شود. غلظت نرمال هموسیستین در انسان $5-15 \mu\text{mol/L}$ است. افزایش غلظت هموسیستین به میزان $5 \mu\text{mol/L}$ سبب افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی به میزان $1/5-1/6$ برابر شده است (۱۶). ۵۰٪ از کل موارد مرگ و میر در بیماران End-stage Renal disease (ESRD) به علت بیماری‌های قلبی - عروقی ناشی از آترواسکلروز می‌باشد. از آنجا که در بیماران دیالیزی فاکتورهای کلاسیک و آترواسکلروز هر دو قابل پیشگیری و بعضی از آنها تعدیل پذیر می‌باشند (۱۰)، اهمیت مطالعات انجام شده در این راستا بیشتر مشخص می‌شود.

در مطالعه Massy شیوع هیپره‌موسیستینمی در بیماران همودیالیزی ۸۰ درصد (۱۱) و در مطالعه دیگری برابر با ۹۷ درصد (۵) بوده است. در اغلب مطالعاتی که در این مورد بر روی بیماران دیالیزی انجام شده افزایش سطح هموسیستین پلاسما گزارش شده است. برای مثال در دو مطالعه سطح هموسیستین پلاسما در بیماران دیالیزی است $32/7 \pm 8/6$ و $50/5 \pm 6/1$ میکرومول در لیتر گزارش شده است (۶، ۱۸). ولی در یک مطالعه که بر روی ۹ کودک همودیالیزی و ۱۲ کودک با دیالیز صفاقی انجام شده میانگین غلظت پلاسمایی هموسیستین برابر $20 \mu\text{mol/L}$ بوده است (۲۰). متابولیسم هموسیستین وابسته به سه کوفاکتور ویتامین B_6 و B_{12} و اسید فولیک است که سبب تبدیل هموسیستین و یا ری-متیلاسیون آن و تبدیل به متیونین می‌شوند (۱۷). در مورد میزان تأثیر دوزاژ فارماکولوژیکی این دارو بر پایین آوردن سطح هموسیستین پلاسما در بیماران دیالیزی مطالعات انجام شده محدود بوده است.

به طور کلی علت افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی به خوبی شناخته نشده است، ولی به نظر می‌رسد کاهش کلیرانس پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی و افزایش سطح پلاسمایی آن به علل اورمی، فاکتورهای ژنتیکی، عوامل وابسته به دیالیز (۱۱) و نیز

کاهش ویتامین‌های اسید فولیک و ویتامین B_{12} باشد (۲۴). به طوری که سطح هموسیستین در افراد دیالیزی حدود سه برابر افراد سالم است (۱).

به نظر می‌رسد افزایش سطح هموسیستین یک عامل خطر جدی برای بروز استئوپروز و شکستگی‌های استخوانی متعاقب آن مخصوصاً در افراد مسن و افراد مبتلا به اختلالات بینایی و سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (۲۰). همچنین مطالعات زیادی به بررسی ارتباط بین بالا بودن سطح هموسیستین و اختلالات قلبی-عروقی پرداخته‌اند. افزایش هموسیستین زمینه‌ساز ترومبوز و بیماری‌های عروق کرونر می‌باشد (۲۱). از طرف دیگر هیپره‌موسیستینمی یکی از عوامل خطر ساز آترواسکلروز محسوب می‌شود (۴). در مطالعه دیگری افزایش هموسیستین پلاسما به عنوان یک عامل مهم پیش‌بینی کننده برای فشار نبض و سفتی شریانی (Arterial stiffness) مطرح شده است (۲۲).

از آنجا که هیپره‌موسیستینمی به عنوان یک عامل خطر ساز مهم برای بسیاری از بیماری‌های قلبی - عروقی مطرح شده است و افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران دیالیزی نیز به وسیله چندین پژوهش گر مورد تأیید قرار گرفته است (۱۴)، درمان این عارضه در بیماران دیالیزی باید مورد توجه قرار گیرد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که درمان با ویتامین باعث کاهش غلظت پلاسمایی هموسیستین می‌شود و در واقع نقص عملکرد اندوتلیال ناشی از هیپره‌موسیستینمی را کاهش می‌دهد و می‌تواند از حوادث قلبی - عروقی جلوگیری کند (۷). همچنین بسیاری از مطالعات نشان داده است که رژیم‌های غذایی حاوی فولیک اسید غلظت پلاسمایی هموسیستین ناشتا را پایین می‌آورند (۲۱).

به طور کلی ویتامین‌های B_6 ، B_{12} و اسید فولیک نقش مهمی را هم به عنوان کوآنزیم و هم سوستر در متابولیسم هموسیستین بازی می‌کنند. از بین این سه، به نظر می‌رسد فولات نقش بیشتری در کاهش غلظت هموسیستین دارد (۱۳).

هم‌زمان با روش رادیوایمنواسی انجام شد. اطلاعات به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

از ۲۵ نفر بیمار گروه مورد ۹ نفر (۳۶ درصد) مرد و ۱۶ نفر (۴۶ درصد) زن بودند. محدوده سنی بیماران ۲۵ تا ۷۲ سال، با میانگین $53/2 \pm 2/5$ سال بود.

بیماران بر اساس مدت زمانی که از شروع دیالیز شدن آنها می‌گذشت و نیز بر اساس سن در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند (جدول ۱ و ۲). در هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر سطح هموسیستین پلاسما دیده نشد.

همچنین بین سطح هموسیستین و سن بیماران رابطه معنی‌داری وجود نداشت ($t=0/188$, $P=0/369$).

جدول ۱: میزان غلظت هموسیستین پلاسما در بیماران بر اساس

مدت زمانی که از شروع دیالیز بیمار می‌گذرد

نتیجه آماری	میانگین \pm انحراف معیار	تعداد بیماران	غلظت هموسیستین ($\mu\text{mol/L}$) مدت (سال)
F=1/8	16/7 \pm 6/6	13	1-3
Df=2	23/9 \pm 11/9	7	3-5
P=0/188	21/6 \pm 7/2	5	5<

جدول ۲: میزان غلظت هموسیستین پلاسما در بیماران بر اساس سن

نتیجه آماری	میانگین \pm انحراف معیار	تعداد بیماران	غلظت هموسیستین ($\mu\text{mol/L}$) سن (سال)
F=0/9	20/3 \pm 8/7	6	20-40
Df=2	16/3 \pm 4/3	8	40-60
P=0/419	21/8 \pm 10/9	11	60<

با توجه به تعداد زیاد بیماران دیالیزی در سطح کشور و این که تاکنون سطح هموسیستین پلاسما در این افراد بررسی نشده، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی غلظت پلاسمایی هموسیستین به عنوان یکی از عوامل خطر ساز مهم و مقایسه آن با غلظت هموسیستین افراد سالم در شهر کرمان در سال ۱۳۸۴ انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی بیماران گروه مورد را ۲۵ بیمار همودیالیزی مراجعه کننده به دو مرکز دیالیز شهر کرمان (بیمارستان شفا و ثامن الحجج) تشکیل می‌دادند. این بیماران روزانه ۱ عدد قرص اسید فولیک 1mg به صورت خوراکی و یک آمپول ویتامین B12 و B Complex پس از هر بار دیالیز به صورت تزریق وریدی دریافت می‌کردند. به بیماران توصیه شد از ویتامین‌های دیگر و یا ویتامین‌های ذکر شده بیش از مقدار متداول حداقل از ۱/۵ ماه قبل از نمونه‌گیری خودداری نمایند. بسته به زمان نوبت دیالیز به بیماران توصیه می‌شد که شب قبل شام سبکی مصرف کنند و صبح روز بعد، قبل از انجام دیالیز، نمونه خون وریدی جهت تعیین مقدار هموسیستین گرفته می‌شد و برای تعیین مقدار هموسیستین پلاسما در لوله‌های آزمایش مخصوص حاوی KEDTA ریخته شده و سریعاً سانتریفیوژ می‌شد. سپس پلاسمای بیماران تا زمان آنالیز در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. آنالیز هموسیستین با دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC-16A Shimadzu) انجام شد (۸).

در گروه کنترل نیز از ۲۵ دانشجوی پزشکی و داروسازی که سالم بوده، سابقه بیماری قلبی-عروقی یا کلیوی نداشته و از داروهای ذکر شده که احتمال تغییر در سطح هموسیستین می‌دهند استفاده نکرده بودند، نمونه‌گیری به صورت ناشتا برای تعیین مقدار پلاسمایی هموسیستین به صورت ذکر شده به عمل آمد. از هر دو گروه، یک نمونه خون وریدی برای تعیین مقدار اسید فولیک و سطح ویتامین B12 سرم نیز گرفته شد. تعیین مقدار این دو ویتامین توسط کیت اختصاصی آن (DRG Diagnostics Germany) و به طور

بر اساس مطالعات انجام شده، سطح هموسیستین در بیماران دیالیزی مستقل از سن است (۳). در مطالعه حاضر نیز تفاوتی بین غلظت هموسیستین بیماران در گروه‌های سنی مختلف و نیز در دو جنس دیده نشد. هم‌چنین مدت زمانی که از دیالیزی شدن بیمار می‌گذشت تأثیری بر سطح هموسیستین نداشت. این یافته در مطالعه Boston و همکاران تأیید شده است (۲).

تأثیر درمان با ویتامین بر سطح پلاسمایی هموسیستین در بیماران همودیالیزی تا حدودی متناقض می‌باشد. به طور مثال براساس مطالعات Naruszewicz و همکاران تجویز ۱۵mg در روز اسید فولیک و ۱۵۰mg در روز ویتامین B₆ و ۱ mg در هفته ویتامین B₁₂ به مدت یک ماه در بیماران همودیالیزی، سبب کاهش هموسیستین پلازما به میزان ۳۳/۶٪ شده است. در این بیماران هموسیستین پایه حدود ۱۰۰٪ از هموسیستین نرمال، بالاتر بوده است (۱۵). ولی در مطالعه دیگری که توسط Hyndman و همکاران انجام شده، تأثیر اسید فولیک در این مورد بسیار کم بوده و تجویز ویتامین B₁₂ نیز نتوانسته هموسیستین را به سطح طبیعی برگرداند (۹).

سطح هموسیستین پایه در بیماران ما هرچند از میزان آن در گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بوده ولی در مقایسه با سایر مطالعات مشابه که در بیماران دیالیزی و بدون ویتامین درمانی و به صورت مقطعی بررسی شده، به مقدار کاملاً فاحشی کمتر بود. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Righetti و همکاران در بیماران همودیالیزی یکی از شهرهای ایتالیا انجام شد متوسط غلظت هموسیستین در بیماران همودیالیزی ۵۹ μmol/L گزارش شده است در حالی که سطح سرمی ویتامین B₁₂ برابر ۴۰۱ ± ۳۲ pg/ml و سطح اسید فولیک برابر ۳۹ ± ۶ ng/ml بوده است (۱۸). در مطالعه Ducloux نیز که در سه گروه ۲۰ نفره از بیماران دیالیزی انجام شد سطح متوسط هموسیستین پلازما برابر ۳۲/۷ ± ۸/۶ μmol/L و مقادیر ویتامین B₁₂ و اسید فولیک به ترتیب برابر ۳۸۲ ± ۱۰۸ pg/ml و ۴/۲ ± ۱/۴ ng/ml بوده است.

میانگین هموسیستین پلازما در مردان ۲۰/۱ ± ۱۱/۷ μmol/L و در زنان ۱۹/۴ ± ۷ μmol/L بود که از لحاظ آماری تفاوت معناداری بین این دو گروه وجود نداشت (P=۰/۵).

میانگین هموسیستین پلازما در بیماران ۱۹/۷ ± ۸/۸ μmol/L و در گروه شاهد ۱۵/۳ ± ۳ μmol/L بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار بود (P=۰/۰۲۴) لازم به ذکر است متغیر سن در دو گروه به عنوان عامل مخدوش‌کننده از مطالعه حذف شد. سطح سرمی ویتامین B₁₂ و اسید فولیک نیز در دو گروه اندازه‌گیری شد که با هم تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه غلظت هموسیستین، فولیک اسید و ویتامین B₁₂

در دو گروه بیمار و شاهد

متغیر	گروه	بیمار	شاهد	P Value
سن (سال)	۵۳/۳ ± ۱۳/۵	۲۳/۲ ± ۱/۳		
هموسیستین (μmol/l)	۱۹/۷ ± ۸/۸	۱۵/۳ ± ۳		۰/۰۲۴
ویتامین B ₁₂ (pg/ml)	۴۶۷۲ ± ۲۳۷۹	۹۵۹ ± ۴۰۹		<۰/۰۰۱
اسید فولیک (ng/ml)	۴۷ ± ۱۷	۱۴ ± ۱۲		<۰/۰۰۱

بحث

مکانیسم‌هایی که در اثر افزایش سطح پلاسمایی هموسیستین، سبب تسریع آترواسکلروز می‌شوند شامل: افزایش ساخته شدن آب اکسیژنه، استرس اکسیداتیو، اختلالات اندوتلیال، افزایش اکسیداسیون LDL، تغییر در لیپوپروتئین a و افزایش احتمال تشکیل لخته در خون است. بر اساس مطالعات بسیاری درمان با ویتامین سبب بهبود اختلالات عروقی می‌شود (۱۹). از طرفی در بیماران دیالیزی سطح سرمی هموسیستین بالا بوده و این بیماران معرض مشکلات قلبی-عروقی و آترواسکلروز زودرس هستند (۱۲).

متیلن تتراهیدوفولات، مصرف مداوم ویتامین‌های B12، B Complex و اسیدفولیک، رژیم غذایی و سایر عوامل نسبت داد. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حداقل در بیماران ما تجویز ویتامین‌ها به صورت ذکر شده و با دوز اندک احتمالاً توانسته مانع از افزایش قابل ملاحظه در غلظت هموسیستین پلاسما شود و حتی اگر نخواهیم ویتامین درمانی با دوز بالا را اجرا کنیم، ادامه روند فعلی می‌تواند به نفع بیماران باشد و پیشنهاد می‌شود روند فعلی تجویز ویتامین ادامه یابد.

در مقایسه با این اعداد و با توجه به نتایج اندازه‌گیری اسید فولیک و ویتامین B12 که در جدول ۳ آمده در می‌یابیم که سطح سرمی ویتامین‌های ذکر شده در بیماران دیالیزی مطالعه حاضر گاهی به چندین برابر مقادیر آنها در مطالعات ذکر شده می‌رسد. هم‌چنین به علت مصرف مداوم داروهای ذکر شده به صورت روزمره، این مقادیر از میزان آن در جمعیت سالم ما نیز بسیار بالاتر بوده است. پایین بودن سطح هموسیستین در بیماران ما نسبت به مطالعات انجام شده در کشورهای دیگر را می‌توان به عوامل مختلفی از قبیل تغییرات ژنتیکی در آنزیم‌های احیاء‌کننده

Summary

Plasma Homocysteine Concentration in Hemodialysis Patients of Kerman/Iran in 2005

Sohrvardi S.M., Ph.D.¹, Azmandian J., MD.², Daryae F., Ph.D.³, Mohammadpoor A.H., Ph.D.⁴, Mehrabani M., Ph.D.⁵

1. Assistant Professor of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy and Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. Assistant Professor of Nephrology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 3. Assistant Professor of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 4. Assistant Professor of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 5. Assistant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Introduction: Homocysteine is an aminoacid yielded from methionin to cysteine metabolism. Normal plasma concentration of homocysteine in human is between 5-15 $\mu\text{mol/l}$ and an increase more than 5 $\mu\text{mol/l}$ can increase the risk of cardiovascular diseases, atherosclerosis and thrombosis. On the other hand in dialysis patients due to some reasons such as uremia, genetic factors, dialysis related factors and vitamin B group deficiency, the plasma level of homocysteine increases. This study was done to evaluate Plasma vitamin B12, Folic acid and homocysteine levels in kerman hemodialysis patients in comparison to healthy persons.

Methods: In this cross-sectional study performed in two hemodialysis units of kerman-Iran, 25 hemodialysis patients and 25 healthy persons were studied. Blood samples were drawn prior to the dialysis session. The samples were centrifuged and the plasma was kept frozen at -20°C until analysis. Homocysteine level was determined by Gas-Chromatography and vitamin levels analysis were determined by radio assay method.

Results: Mean homocysteine level in hemodialysis patients ($19.7 \pm 8.8 \mu\text{mol/l}$) showed significant difference ($P=0.024$) with healthy persons' homocysteine level ($15.3 \pm 3 \mu\text{mol/l}$). There were no relationship between the time passed since the first dialysis ($p=0.188$) and patients' age ($p=0.419$) with homocysteine levels. Plasma vitmin B12 and folic acid levels in hemodialysis patients were $4672 \pm 2379 \text{ pg/ml}$ and $47 \pm 17 \text{ ng/ml}$ respectively. These values were much more than those in healthy persons ($959 \pm 409 \text{ Pmol/L}$ and $14 \pm 12 \text{ nmol/L}$ respectively).

Conclusion: Although homocysteine level in our patients was more than healthy persons, but it was lower than that of hemodialysis patients in other countries. This difference may be related to some factors such as

genetic factors and administration of daily oral folic acid and Intravenous injection of B12 and B Complex after each dialysis session. Therefore this procedure is recommended in hemodialysis patients.

Key Words: Homocysteine, Hemodialysis, Vitamin B12, Acid folic

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 117-123

References

1. Arnadottir M, Hultberg B, Wahlberg J, Fellstorm B, Dimeny E. Serum total homocysteine concentration before and after renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1380-4.
2. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, Tume AL, Yoburn D, Nadea U, *et al.* High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49(1): 147-52.
3. Caliskan S, Kuralay F, Onvural B. Effect of anticoagulants on plasma homocysteine determination. *Clin Chim Acta* 2001; 309(1): 53-6.
4. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, *et al.* Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828): 1111-15.
5. De vecchi AF, Bamonti-Finazzi S, campo J, Taioli E, Novemberino C, Colucci P, *et al.* Homocysteine, Vitamin B12 and serum erythrocyte folate in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Perit Dial Int* 2000; 20(3): 169-73.
6. Ducloux D, Aboubakr A, Motte G, Toubin G, Fournier V, Chalopin JM, *et al.* Hyperhomocysteinemia therapy in haemodialysis patients: Folinic versus folic acid in combination with B6 and B12. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(5): 865-70
7. Hackam DG, Peterson JC, Spence JD. What level of plasma homocyst(e)ine should be treated? Effects of vitamin therapy on progression of carotid atherosclerosis in patients with homocysteine levels above and below 14 mmol/L. *Am J Hypertensi* 2000; 13(1 pt 1): 105-10.
8. Husek P, Matucha P, Vrankova A, Simek P. Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic aminoacid. *J Chromatogr Anal B Technol Biomed Life Sci* 2003; 789(2): 311-22.
9. Hyndman ME, Manns BJ, Snyder FF, Bridge PJ, Scott-Douglas NW, Fung E, *et al.* Vitamin B₁₂ decreases, but dose not normalize homocysteine and methylmalonic acid in ESRD. *Metabolism* 2003; 52(2): 168-72.
10. Kennedy R, Case C, Fathi R, Johnson D, Isbel N, Marwick TH, *et al.* Dose renal failure cause an atherosclerotic milieu in patients with end-stage renal disease? *Am J Med* 2001; 110(3): 198-204.
11. Massy ZA. Importance of homocysteine, lipoprotein(a) and non-classical cardiovascular risk factors (fibrinogen and advanced glycation end-products) for atherogenesis in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 suppl 5: 81-91.
12. Miyao MK, Hosoi T, Shiraki M, *et al.* Possible involvement of increasing plasma homocysteine level in the age dependent bone loss. *J Bone Minerres* 2000; 15: 459-473.
13. Moson JB, Miller JW. The effect of vitamins B12, B6 and folate on blood homocysteine levels. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 197-203.
14. Moustapha A, Naso A, Nahlawi M, Gupta A, Arheart KL, Jacobsen DW, *et al.* Prospective

- study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* 1998; 97(2): 138-141.
15. Naruszewicz M, Klinke M, Dziewanowski K, Staniewicz A, Bukowska H. Homocysteine, fibrinogen and lipoprotein(a) levels are simultaneously reduced in patients with chronic renal failure treated with folic acid, pyridoxine and cyanocobalamin. *Metabolism* 2001; 50(2): 131-4.
 16. Nekrassova O, Lawrence NS, Compton RG. Analytical determination of homocysteine. A review, *Talanta* 2003; 60: 1085-1095.
 17. Pietrzik K, Bronstrup A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatric* 1998; 157 suppl 2: 135-138.
 18. Righetti M, Ferrario GM, Milani S, Serbelloni P, La Rosa L, Uccellini M, et al. Effects of folic acid treatment on homocysteine levels and vascular disease in hemodialysis patients. *Med Sci Monit* 2003; 9(4): P119-24.
 19. Schnyder G, Roffi ME, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, et al. Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N Engl J Med* 2001; 345(22): 1593-600.
 20. Schroder CH, de Boer AW, Giesen AM, Monnens LA, Blom H. Treatment of hyperhomocysteinemia in children on dialysis by folic acid. *Pediatr Nephrol* 1999; 13(7): 583-5.
 21. Steenge GR, Verhoef P, Katan MB. Betaine supplementation lowers plasma homocysteine in healthy men and women. *J Nutr* 2003; 133(5): 1291-5.
 22. Tsai JC, Kuo HT, Chiu YW, Hwang SJ, Chuang HY, Chang JM, et al. Correlation of plasma homocysteine level with arterial stiffness and pulse pressure in hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 2005; 182(1): 121-7.
 23. Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, Van der klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350(20): 2033-41.
 24. Vychytil A, Fodinger M, Papagiannopoulos M, Wolf G, Horl WH, Sunder Plassmann G. Peritoneal elimination of homocysteine moieties in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55(5): 2054-61.

سمیت جنینی ترکیب طبیعی ضد سرطان HESA-A در موش سوری

دکتر سید عادل معلم^{۱*}، دکتر امرا.. احمدی^۲، دکتر محمد حسن مصحفی^۳، محمد حسن تقوی^۴

خلاصه

مقدمه: HESA-A یک ترکیب طبیعی فعال با منشأ دریایی و گیاهی است که شامل اجزای معدنی، آلی و آب می باشد. اثرات آنتی اکسیدانت، سیتوتوکسیک و ضد سرطان این ماده گزارش شده است. در این مطالعه اثرات تراژونیک این ماده در موش سوری بررسی گردید.

روش: HESA-A در چندین دز به صورت خوراکی از روز ششم تا چهاردهم به موش های باردار تجویز گردید. پارامترهای متعددی در موش های باردار و جنین ها طی دوران بارداری و پس از آن بررسی و ثبت گردید. در پایان حاملگی جنین ها خارج شده و مورد مطالعه مورفولوژی خارجی قرار گرفته و با رنگ آمیزی اختصاصی ناهنجاری های اسکلتی بررسی گردید.

یافته ها: بررسی افزایش وزن موش های باردار نشان می دهد که فقط در حداکثر دوز به کار رفته این افزایش وزن دچار اختلاف شده است. همچنین فقط دوزهای بالا باعث کاهش وزن رحم، افزایش باز جذب جنین ها، کاهش تعداد جنین های زنده و وزن و قد جنین ها در مقایسه با گروه کنترل گردید. همچنین دوزهای پایین و متوسط منجر به بروز اختلالات خارجی و اسکلتی قابل توجهی نشده است، لیکن دوزهای بالای HESA-A باعث ناهنجاری هایی مانند کوتاهی دست و پا، پیچ خوردگی ستون مهره ها، کیست پوستی، میکروفتالمیا و شکاف کام گردید.

نتیجه گیری: عوارض و اختلالات جنینی در دزهای بالای HESA-A که چندین برابر دوزهای درمانی است، ظاهر می شوند. لیکن در دوزهای پایین تر که قابل مقایسه با دوزهای درمانی است عوارض جنینی قابل ملاحظه نسبت به گروه کنترل دیده نشد. مکانیسم پیدایش این عوارض مشخص نیست و نیاز به بررسی بیشتر دارد.

واژه های کلیدی: HESA-A، موش سوری، سمیت جنینی

۱- استادیار گروه فارماکودینامی و سم شناسی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۲- پزشک محقق انستیتو تحقیقات سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۳- دانشیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- مربی گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

* نویسنده مسؤول: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ● آدرس پست الکترونیک: moallem@mums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۱۸ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۲۰

مقدمه

HESA-A یک ترکیب طبیعی فعال با منشأ دریایی و گیاهی می‌باشد که به دلیل خواص بیولوژیک آن در ایران ثبت گردیده است و به تازگی مجوز تولید را از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران دریافت کرده است. در مطالعات متعدد حیوانی و انسانی، HESA-A اثرات ضد سرطان قوی با اثر کم بر سلول‌های طبیعی از خود نشان داده است.

در یک مطالعه، این ترکیب اثرات انتخابی وابسته به غلظت و قابل مقایسه با دوکسورویسین بر ضد رشد سلول‌های سرطانی HepII، MDA-MD-468 و Hela بدون اثر قابل توجه بر سلول‌های طبیعی از خود نشان داد (۱۸). در یک تحقیق *in vivo* در خرگوش، دوز روزانه ۳۵۰ mg/kg از HESA-A منجر به کاهش تدریجی اندازه تومور استئوسارکوم شده و در عرض ۱۰ هفته تومورها ناپدید گردیدند به نحوی که تمام خرگوش‌های این گروه زنده ماندند. لیکن خرگوش‌های گروه کنترل در این مدت از بین رفتند و بررسی‌های آسیب‌شناسی اثرات درمانی HESA-A را تأیید نمود (۵). در یک مطالعه بالینی دو سوکور، ۲۴ بیمار دچار سرطان پستان با متاستاز Choroidal تحت درمان با ۵۰ mg/kg/day از HESA-A قرار گرفتند که بهبودی قابل ملاحظه در بینایی و تحمل درد بیماران در مقایسه با گروه شاهد گزارش گردید (۴). در یک مطالعه مقدماتی (pilot)، اثر قابل توجه HESA-A در کاهش شدت و تعداد حملات در بیماران مولتیپل اسکلروزیس (MS) مشاهده گردید (داده‌های چاپ نشده). HESA-A اثرات ضد اکسیدان و رادیکال‌های آزاد نیز از خود نشان داده است (۱۸). اثرات محافظت کبدی HESA-A بر علیه سمیت کبدی حاصل از تیواستامید در خرگوش نیز گزارش گردیده است (۶).

مطالعات سم‌شناسی نشان داده‌اند که اثرات سمی حاد HESA-A در مقادیر بالاتر از ۱۰ g/kg در موش سوری ظاهر می‌شود و LD₅₀ برای موش سوری ۱۶ g/kg و در رت ۱۸g/kg گزارش گردید. بر این اساس و بر پایه مطالعات تکمیلی پاتولوژیک بیوشیمیایی و خون‌شناسی نتیجه گرفته

شده است که سمیت HESA-A در موش سوری و رت بسیار کم است (۱). بررسی جهش‌زایی فرآورده HESA-A با استفاده از تست ایمن نشان می‌دهد که تعداد کلنی‌های رپورتانت با کنترل منفی تفاوت معنی داری ندارد و این فرآورده از نظر جهش‌زایی بی‌اثر است (۳).

آنالیز HESA-A نشان داده است که این ماده شامل ۵۰٪ جزء معدنی، ۴۵٪ جزء آلی از نوع آمیدواتراکینون و ۵٪ آب می‌باشد. جزء معدنی شامل مخلوطی از کربنات کلسیم، سولفات و فسفات منیزیم، پتاسیم و سدیم می‌باشد. همچنین فلزاتی نظیر آلومینیوم، کبالت، پتاسیم، کروم، آهن، روی و نیز برم و استرانسیم با غلظت بالایی در این ترکیب موجود می‌باشد (۲). با توجه به مواد متشکله احتمال تراوتوژنیسیته وجود دارد.

کاملاً مشخص است که بسیاری از داروهای ضد سرطان اثرات تراوتوژن از خود نشان می‌دهند و اثرات سمی بر روی جنین دارند زیرا سلول‌های جنینی از سرعت پرولیفراسیون بالایی برخوردار بوده و به دلیل غیر اختصاصی بودن تاثیر داروها بر روی سلول‌های جنینی و سلول‌های سرطانی، اثرات تراوتوژنیک این داروها آشکار می‌گردد. این مطالعه به منظور بررسی پتانسیل تراوتوژنیسیته HESA-A و تعیین دوز سمی بر روی جنین موش شکل گرفته است.

روش بررسی

پودر HESA-A (مؤسسه دکتر احمدی، اصفهان) به مدت ۱ ساعت در نرمال سالین اسیدی شده با HCl حل شد و سپس pH محلول حاصل با NaOH در حد ۷/۴ تعدیل شد (۱۸). مخلوط حاصل فیلتر شد و با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از روز ششم تا چهاردهم بارداری به صورت خوراکی روزانه به موش‌ها به روش گاوژ تجویز شد (۱۷). از نرمال سالین و سیکلوفسفامید (۱۵ mg/kg) به عنوان کنترل منفی و مثبت، به ترتیب، استفاده گردید.

حیوانات آزمایشگاهی

موش‌های سوری ماده از نژاد BALB/c با محدوده وزنی ۳۰ - ۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها از اتاق حیوانات مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی تهیه شده و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی - ۱۲ ساعت روشنایی و دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت مناسب نگهداری می‌شدند. یک موش نر با ۵ موش ماده برای جفت‌گیری در نظر گرفته می‌شد. سه ساعت بعد از جفت‌گیری، موش‌های ماده از نظر وجود پلاک واژن بررسی و موش‌های واجد پلاک به عنوان باردار روز صفر (GD₀) در نظر گرفته می‌شدند (۸، ۱۱، ۱۷). در هر گروه ۱۵ موش برای بارداری در نظر گرفته شد.

خارج کردن جنین‌ها و رنگ‌آمیزی

موش‌های باردار در روز ۱۸ بارداری با کلروفورم بی‌هوش شده، شکم در ناحیه بالای رحم باز شده و لوله‌های رحمی همراه با تخمدان خارج و وزن شدند. سپس جنین‌ها را از کیسه آمینوتیک خارج کرده و تعداد کل جنین، تعداد جنین‌های مرده و زنده، وزن ($\pm 1 \text{ mg}$)، قد ($\pm 0.1 \text{ mm}$) و تعداد باز جذب زودرس و دیررس مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲). جنین‌ها پس از خارج شدن از کیسه آمینوتیک به مدت ۲۴ ساعت داخل استون قرار گرفتند. سپس پوست آنها جدا شده و در محلول رنگ شامل آلسیان بلو (Alizarin Red-S, Sigma, UK)، آلیزارین رد-اس (Alizarin Red-S, Sigma, UK) و اتانول و اسیداستیک قرار گرفته و با استفاده از امواج مایکروویو رنگ‌آمیزی شدند (۹). مرحله شفاف‌سازی در محلولی شامل پتاسیم هیدروکسید ۱٪، اتانل ۹۵٪ و گلیسرین به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس جنین‌ها از نظر وجود ناهنجاری‌های ساختمانی که شامل متغیرهای اناتومیکی و مورفولوژیک و اسکلتی و استخوانی بود، با استفاده از استرئومیکروسکپ با صفحه مدرج (Zeiss) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۳، ۱۶، ۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد برای هر گروه آزمایش گزارش شدند. سپس به منظور بررسی وجود یا عدم اختلاف میانگین بیش از دو گروه برنامه کامپیوتری Instat، آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن، آزمون Tukey-Kramer انجام شد. نتایجی که دارای ارزش P کوچک‌تر یا مساوی ۰/۰۵ بود، به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان تغییرات وزن موش‌های باردار از روز ۰ تا ۱۸ در دوزهای مختلف در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. تجویز خوراکی HESA-A از روز ششم بارداری آغاز شد. نتایج نشان می‌دهند که در گروه‌های کنترل و دوزهای کمتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از GD₀ تا GD₁₈ اضافه وزن بدون هیچ اختلافی پیش رفته است، ولی در گروه دریافت کننده دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فقط در روز ۱۴ اضافه وزن دچار اختلال شده است. موش‌های گروه دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از روز ۸ به بعد به طور محسوسی دچار اختلال وزن گردیدند. علی‌رغم قطع دارو در روز چهاردهم، این کاهش وزن تا روز هجدهم ادامه داشته است.

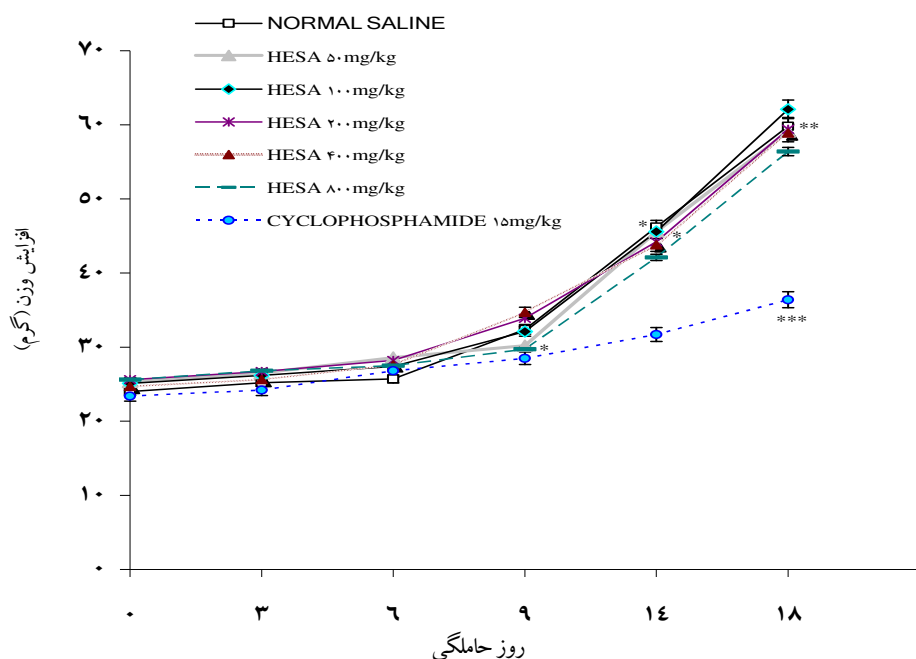
در جدول شماره ۱، متغیرهای مورد بررسی شامل تعداد موش‌های ماده برای جفت‌گیری، تعداد موش‌های باردار، ایندکس باروری، تعداد موش‌های باردار مورد مطالعه، وزن رحم، تعداد جسم زرد، تعداد لانه‌گزینی، تعداد سقط‌های قبل از لانه‌گزینی، تعداد بازجذب، میانگین تعداد جنین‌ها در هر موش، تعداد کل جنین‌های یک گروه، میانگین تعداد جنین‌های زنده در هر موش باردار، وزن جنین، قد جنین و نسبت جنسیت ثبت شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود وزن رحم در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش محسوسی در مقایسه با نرمال سالین دارد ($P \leq 0.01$). سقط قبل از لانه‌گزینی فقط در بالاترین دوز تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.05$)

همچنین اختلالات خارجی مشاهده شده در جنین‌های دریافت کننده دوزهای متفاوت HESA-A ذکر شده است که نشانگر افزایش برخی از اختلالات در دوزهای بالای HESA-A می‌باشد.

در شکل شماره ۱ تصویر A مربوط به جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد که کوتاهی پا در آن مشخص می‌باشد. تصویر B مربوط به جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد که دچار کوتاهی دست است. در تصویر C پیچ‌خوردگی ستون مهره‌ها در جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده می‌شود. تصویر D مربوط به جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد که هیدروسفالی در آن مشخص است. تصویر E پیچ‌خوردگی اندام‌ها در جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده می‌شود. در تصویر F جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دچار کوتاهی گردن می‌باشد.

با گروه نرمال‌سالین دارد. تعداد موارد بازجذب (سقط بعد از لانه‌گزینی) نیز در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش داشته و این افزایش در مقایسه با نرمال‌سالین معنی‌دار است ($P \leq 0/01$). تعداد جنین باقی مانده که در روز هجدهم از رحم موش‌های باردار خارج شدند در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال‌سالین، به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P \leq 0/01$). تعداد جنین‌های زنده نیز کاهش معنی‌داری در مقایسه با نرمال‌سالین داشته است ($P \leq 0/001$). وزن جنین‌ها در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نرمال‌سالین کاهش معنی‌داری نشان داده است ($P \leq 0/01$). قد جنین‌ها نیز در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۴۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نرمال‌سالین به‌طور معنی‌داری کاهش داشته است ($P \leq 0/05$).

در جدول شماره ۲، تعداد جنین‌های بررسی شده در دو گروه اختلالات خارجی و اسکلتی مشاهده می‌شوند.



نمودار ۱: بررسی تغییرات وزن موش‌های باردار دریافت کننده HESA-A با دوزهای متفاوت از روز اول

تا بیستم بارداری در مقایسه با نرمال‌سالین و سیکلوفسفامید

$P \leq 0/001$: *** $P \leq 0/01$: ** $P \leq 0/05$: *

می باشد که غضروف های دست تشکیل نشده است. تصویر B مربوط به جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم می باشد که غضروف های پا تشکیل نشده است. تصویر C مربوط به جنین دریافت کننده HESA-A با دوز ۴۰۰ میلی گرم می باشد که زائده های دنده ای به خوبی در آن مشخص است. در تمام مطالعات فوق از نتایج سیکلوفسفامید به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

اختلالات اسکلتی مشاهده شده در جنین های دریافت کننده دوزهای مختلف HESA-A در جدول شماره ۳ آورده شده است که اختلالات مختلفی از جمله استخوانی نشدن استخوان های مختلف و کوتاهی دنده ها مشاهده شد. شدت این اختلالات نیز وابسته به دوز بود. در شکل شماره ۲ اختلالات اسکلتی مشاهده می شود. تصویر A مربوط به جنین دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم

جدول ۱. میانگین متغیرهای مورد مطالعه در موش های باردار دریافت کننده دوزهای مختلف HESA-A از روز ششم تا چهاردهم بارداری. x، xx و xxx به ترتیب نشان دهنده $P \leq 0.05$ ، $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ می باشند.

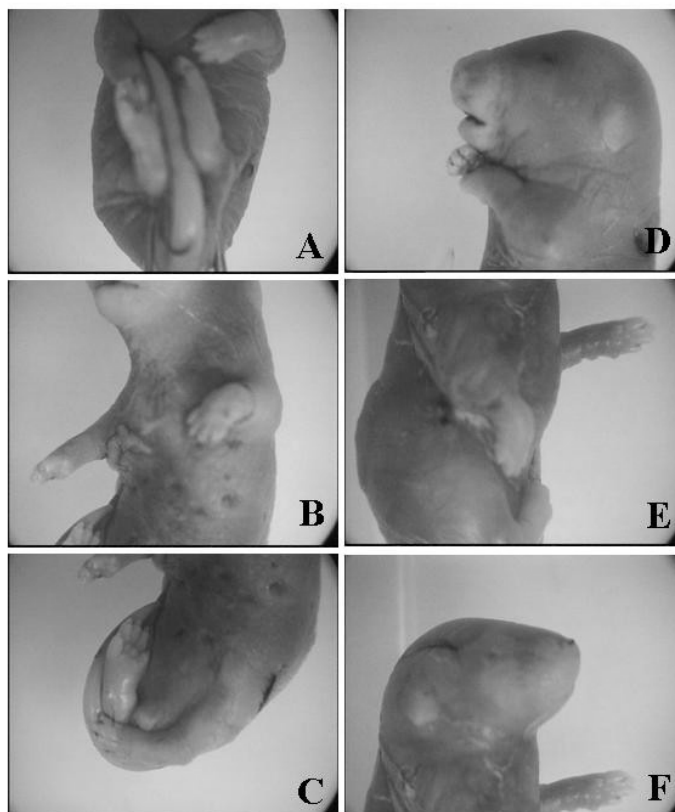
نرمال سالین	سیکلوفسفامید ۱۵	HESA-A (mg/kg)					گروه، متغیر
		۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	
۲۰	۱۹	۱۱	۱۰	۱۴	۱۲	۱۰	تعداد باردار
۱۴	۱۴	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	تعداد موش های باردار مورد مطالعه
$18 \pm 1/4$	$16.3 \pm 1/8^x$	$14.4 \pm 1/4^{xxx}$	$14.9 \pm 1/2^{xxx}$	$15.27 \pm 2/1$	$16.41 \pm 1/3$	$17.49 \pm 1/1$	وزن رحم/ موش باردار (g)
۲	۵ ^{xx}	۶ ^{xx}	۵ ^{xx}	۳	۲	۲	تعداد بازجذب/ موش باردار
۱۴	۷ ^{xx}	۸ ^{xx}	۷ ^{xx}	۱۱	۱۱	۱۲	تعداد جنین/ موش باردار
۱۹۶	۹۸	۸۰	۷۰	۱۱۰	۱۱۰	۱۲۰	کل تعداد جنین
۱۳	۶ ^{xxx}	۶ ^{xxx}	۶ ^{xxx}	۹ ^{xx}	۱۰	۱۱	جنین زنده/ موش باردار
1528 ± 121	77 ± 45^{xxx}	1035 ± 89^{xx}	1187 ± 78^{xxx}	1273 ± 98	1329 ± 111	1344 ± 83	وزن جنین (mg)
$14/1 \pm 0/8$	$6/9 \pm 0/3^{xxx}$	$11/4 \pm 0/8^x$	$11/9 \pm 0/6^x$	$12/1 \pm 0/7$	$12/7 \pm 1/1$	$13/4 \pm 0/9$	قد جنین (mm)
۸۵/۸۳	۹۷/۹۹	۵۹/۵۰	۴۰/۵۱	۶۹/۷۰	۸۹/۷۵	۷۴/۷۳	ماده / نر

جدول ۲: اختلالات خارجی در جنین های دریافت کننده ترکیب HESA-A با دوزهای متفاوت

نرمال سالین (۱۰ ml/kg)	سیکلوفسفامید (۱۵ mg/kg)	HESA-A (mg/kg)					دوز	یافته های خارجی
		۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰		
۱۱۰	۴۵	۳۷	۳۳	۴۵	۴۵	۴۵	تعداد جنین های بررسی شده از نظر اختلالات خارجی	
۱	۱۸	۱۴	۴	۲	۱	۲	تعداد جنین های دچار اختلال	
-	۳	۸	-	-	-	-	کیست پوستی	
-	-	۸	-	-	-	-	میکروفتالمیا	
-	-	۷	-	-	-	-	آسیب دیواره بینی	
۱	۹	۶	۳	۱	-	۱	شکاف کام	
-	۳	۷	-	-	۱	-	هیدروسفالی	
-	۲	۳	۱	-	-	-	گاستروشیزیس	
-	۳	۱	-	-	۱	-	همورژی زیر پوستی	

جدول ۳: بررسی یافته‌های اسکلتی در جنین‌های دریافت کننده ترکیب HESA-A با دوزهای متفاوت

نرمال سالین (۱۰ ml/kg)	سیکلو فسفامید (۱۵mg/kg)	HESA-A (mg/kg)					دوز	یافته‌های اسکلتی
		۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰		
۷	۴۱	۳۲	۳۳	۳۹	۴۸	۶۹	تعداد جنین‌های بررسی شده از نظر اختلالات اسکلتی	
۱	۱۸	۱۲	۸	۲	۲	۱	تعداد جنین‌های دچار اختلال	
-	۱۳	۹	۵	-	۱	-	کاهش استخوان‌سازی	
-	-	۵	۴	-	-	۱	جناغ جوش خورده	
-	۱۱	۹	۳	۱	۲	-	کوتاهی استخوان‌های بلند	
-	۱۱	۱۱	۲	۱	۱	-	کوتاهی دنده‌ها	
-	۸	۹	۶	-	۱	-	زائده دنده‌ای	
-	۶	۱	-	-	-	-	استخوانی نشدن مهره‌های دم	
-	-	-	۱	۱	-	-	پیچش نامناسب اندام‌ها	
۴	-	۷	۳	-	-	-	کوتاهی دست و پا	



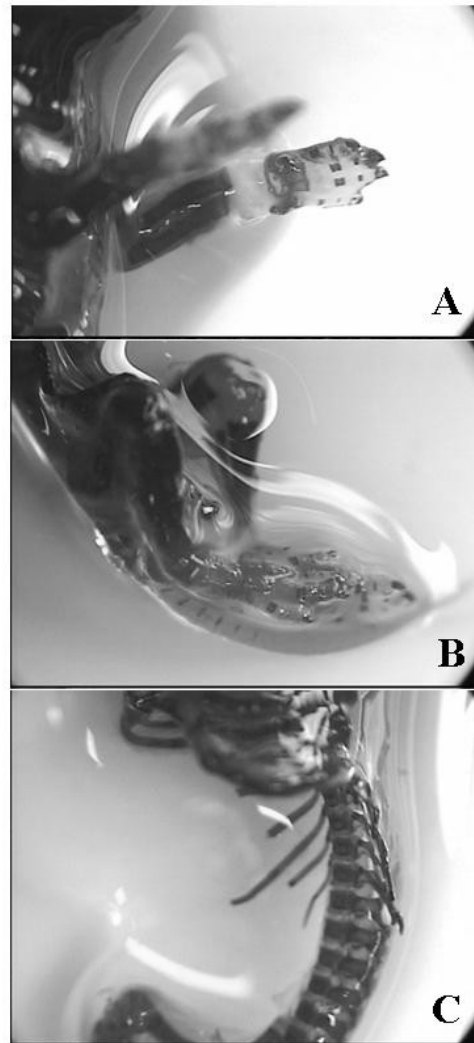
شکل ۱: اختلالات خارجی در جنین‌های دریافت کننده HESA-A با دوز ۴۰۰ mg/kg (A: کوتاهی پا، D: هیدروسفالی، E: پیچ‌خوردگی اندام‌ها)

(B: کوتاهی دست، C: پیچ‌خوردگی ستون مهره‌ها، F: کوتاهی گردن)

دریافت کننده نرمال سالین دارد که نشان دهنده تأثیر طولانی مدت و مزمن این ترکیب بر وضعیت تغذیه‌ای موش‌ها می‌باشد. از طرفی دیگر دوزهای پایین و متوسط HESA-A اثر چندانی بر افزایش وزن موش‌های باردار ندارند که نشان دهنده نداشتن سمیت عمومی بر موش‌های باردار می‌باشد.

وزن رحم در گروه‌های دریافت کننده ترکیب HESA-A با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه نرمال سالین داشته است که احتمالاً به علت ایجاد اختلال در رشد داخل رحمی توسط این ترکیب بوده است. مطالعات انجام شده بر روی برخی مواد تراتوژن نظیر سولفات کبالت نشان می‌دهند که کاهش جریان خون جفت و در نتیجه، کاهش خونرسانی به جنین و اختلال در متابولیسم مادر یا جنین باعث کاهش رشد داخل رحمی می‌شود (۱۹،۲۱). بر این اساس، احتمالاً ترکیب HESA-A از طریق کاهش خونرسانی به جنین و اختلال در متابولیسم مادر یا جنین باعث کاهش رشد داخل رحمی شده است. افزایش وابسته به دوز در تعداد سقط بعد از لانه‌گزینی یا بازجذب نیز نشان می‌دهد که این ترکیب باعث مرگ زودرس جنین شده است. کاهش قد و وزن جنین و افزایش در تعداد جنین‌های مرده نسبت به کل جنین‌ها در هر موش نیز موید این مطلب است که HESA-A به صورت وابسته به دوز موجب سمیت جنینی می‌شود.

همان‌طور که اشاره شد، HESA-A به صورت وابسته به دوز میزان اختلالات اسکلتی و خارجی را افزایش می‌دهد. در مورد نوع اختلالات خارجی نظیر هیدروسفالی، گاستروشیزیس و هموراژی زیر پوستی احتمالاً ترکیبات آلی موجود در HESA-A باعث این اختلالات شده‌اند زیرا مطالعات مختلف نشان می‌دهند ترکیبات آلی (نظیر فرمالدئید و بنزین) از جمله ترکیبات تراتوژن قوی می‌باشند (۷،۱۰،۲۰). اختلالات اسکلتی مشاهده شده در جنین‌های دریافت کننده HESA-A، بیشتر به صورت عدم استخوانی شدن استخوان‌های مختلف بوده است که احتمالاً به علت جایگزینی کلسیم با فلزات سنگین موجود در



شکل ۲: اختلالات اسکلتی در جنین‌های دریافت کننده HESA-

A با دوز ۴۰۰ mg/kg (C: زائده‌دنه‌ای) و ۸۰۰ mg/kg (A: عدم

تشکیل غضروف‌های دست B: عدم تشکیل غضروف‌های پا)

بحث

همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تغییرات وزن موش‌های باردار از روز ۰ تا ۶ به طور طبیعی پیشرفته است ولی در گروه دوز بالا HESA-A از روز ۶ تغییرات اضافه وزن با الگوی متفاوت از نرمال سالین پیشرفته است. هر چند تجویز HESA-A از روز چهاردهم قطع شده است اما الگوی افزایش وزن همچنان تفاوت معنی‌داری با گروه

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه HESA-A حتی در دوزهایی چندین برابر دوزهای درمانی اثری بر پارامترهای رشد، ساختارهای اناتومیکی خارجی و رشد غضروف و استخوان جنین موش سوری ندارد. لیکن در دوزهای بسیار بالاتر بر روی جنین موش اثرات جانبی متفاوتی نشان می‌دهد. البته باید در نظر داشت که دوزهای فوق بسیار بالاتر از دوزهایی است که در کلینیک استفاده می‌شود. در هر صورت مصرف هر دارویی در دوران بارداری باید با دقت چندین برابر صورت پذیرد و در واقع منافع و مضرات آن در کنار هم سنجیده شده و ارزیابی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در تصویب طرح پژوهشی و از خانم تکم حسینی در کمک به انجام کارهای عملی تشکر می‌شود.

ترکیب HESA-A می‌باشد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که فلزات سنگین نظیر روی و جیوه با همین مکانیسم باعث ایجاد ناهنجاری‌های استخوانی در جنین می‌شود. در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم HESA-A که ۴ برابر دوز مصرفی در کلینیک است ناهنجاری‌های قابل ملاحظه‌ای در جنین موش سوری دیده نمی‌شود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که این ترکیب در دوزهای مصرفی در کلینیک هیچ اثر سمی بر روی جنین موش نداشته است. که تقریباً در مورد اکثر داروهای ضدسرطان این نتیجه مشاهده نمی‌شود (۱۴،۲۳). اکثر ترکیبات ضد سرطان با همان دوزی که در کلینیک استفاده می‌شوند روی جنین نیز اثرات سمی دارند و این در حالی است که در مورد این ترکیب این اثر مشاهده نشده است. بنابراین ترکیب HESA-A در دوزهای بالا پتانسیل ایجاد سمیت جنینی دارد. بحث در مورد مکانیسم تراژوژنیسیته این ترکیب احتیاج به آزمایشات گسترده دارد.

Summary

Evaluation of Fetal Toxicity of HESA-A, a Natural Anticancer Agent, in Mice

Moallem SA, Ph.D.¹, Ahmadi A, MD.², Moshafi MH, Ph.D.³, Taghavi MM. M.Sc.⁴

1. Assistant Professor of Pharmacodynamics & Toxicology, School of Pharmacy, Pharmaceutical Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 2. Researcher, Cancer Research Institute, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran Iran. 3. Associate Professor of Microbiology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 4. Instructor, Department of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Introduction: HESA-A is an active natural compound with herbal and marine origin. It contains inorganic, organic and aqueous fractions, and has shown antioxidant, cytotoxic and anticancer effects. In this study, the teratogenic effects of HESA-A in mice have been evaluated.

Methods: Several doses of HESA-A were administered orally to pregnant mice on days 6 to 14 of gestation. Various parameters in pregnant mice and embryos during and after pregnancy were evaluated and recorded. At the end of pregnancy, embryos were sectioned out and studied for external morphological abnormalities and by specific skeletal staining for skeletal malformations.

Results: Weight gain of pregnant mice showed that only the highest dose (800 mg/kg) caused gain retardation. Also, only the highest dose led to reduction of uterus weight, number of viable embryos, and weight and crown-lump length of embryos. Increase in fetal resorption by the highest dose of HESA-A was another important observation. Low and medium doses of HESA-A did not cause any significant external or

skeletal abnormalities. However, higher doses caused embryo malformations such as short limbs, spinal abnormalities, dermal cysts, microphthalmia, and cleft palate.

Conclusion: According to this study, only high doses of HESA-A, which are many times higher than the usual therapeutic doses, may cause embryonic toxicity. Mechanisms of these abnormalities are not clear and need to be determined.

Key words: HESA-A, Embryotoxicity, Mice

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2):124-133

منابع

۱. بلالی مود، مهدی؛ احمدی، امرا...؛ بلالی مود، کیا؛ قفقازی، تقی؛ رجیبی، پروین و طاهر مسیح...: ارزیابی سمیت یک ترکیب دریایی ضد تومر (HESA-A) در موش سوری و موش صحرائی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. دوره دوازدهم، شماره ۲، ص ۵-۱۲.
۲. شهابی، احمد و شیرینی، رضا: نتایج آنالیز HESA-A. مرکز تحقیقات و تولید سوخت اصفهان، بخش راکتور مینیاتوری، ۱۳۷۹.
۳. گزارش آزمایشگاه کنترل میکروبی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۸۲.
4. Ahmadi A, Mohagheghi MA, Fazeli MS Nahavandian B, Bashardoost N, Monsavi Jarahi A, et al. HESA-A: new treatment for breast cancer and choroidal metastasis. *Med Sci Monit* 2005; 11(6): CR300-303.
5. Ahmadi A, Mohagheghi MA, Sharif-Tabrizi A. Introducing the therapeutic effects of HESA-A on osteosarcoma induced in rabbits. Proceedings of the First National Congress on Cancer Research, Orumiah, Iran, April 5-8, 2001.
6. Ahmadi A, Naderi G, Asgari S. Evaluation of hepatoprotective potential of HESA-A (a marine compound) pretreatment against thioacetamide-induced hepatic damage in rabbits. *Drugs Exp Clin Res* 2005; 31(1): 1-6.
7. Andrews JE, Ebron-McCoy M, Schmid JE, Svendsgaard D. Effects of combinations of methanol and formic acid on rat embryos in culture. *Teratology* 1998; 58(2): 54-61.
8. Bernard BK, Hoberman AM. A study of the developmental toxicity potential of pentachlorophenol in the rat. *Int J Toxicol* 2001; 20(6): 353-62.
9. Celal il-gaz K. Application the microwave beam radiation in double skeleton method. *Gazi Med J* 1997; 8:151-155.
10. Cooper JR, Mattie DR. Developmental toxicity of JP-8 jet fuel in the rat. *J Appl Toxicol* 1996; 16(3): 197-200.
11. Driscoll CD, Valentine R, Staples RE, Chromey NC, Kennedy GL. Developmental toxicity of diglyme by inhalation in the rat. *Drug Chem Toxicol* 1998; 21(2): 119-36.
12. Fascineli ML, Hunter ES, De Grava Kempinas W. Fetotoxicity caused by the interaction between zinc and arsenic in mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22(5): 315-27.
13. Kim BJ, Kim MS, Kim KB, Kim KW, Hong YM, Kim IK, et al. Sensitizing effects of cadmium on TNF-alpha- and TRAIL-mediated apoptosis of NIH3T3 cells with distinct expression patterns of p53. *Carcinogenesis* 2002; 3:1411-7.
14. Kimm-Brinson KL, Ramsdell JS. The red tide toxin, brevetoxin, induces embryo toxicity and developmental abnormalities. *Environ Health Perspect* 2001; 109(4): 377-81.
15. Li Y, Yu ZL. Effect of zinc on bone metabolism in fetal mouse limb culture. *Bio Med Environ Sci* 2002; 15(4): 323-9.

16. Lutz J, Beck SL. Caffeine decreases the occurrence of cadmium-induced forelimb ectrodactyly in C57BL/6j mice. *Teratology* 2000; 62(5): 325-31.
17. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Codes of Good Laboratory Practice (GLP). May 1982, Doc C (81)30 (Final) Annex2.
18. Sadeghi-Aliabadi H, Ahmadi A. Cytotoxicity and antitumor properties of a marine compound on cancer cells (HESA-A). *MJIAS* 2003; 13:55-61.
19. Szakmary E, Ungvary G, Hudak A, Tatrai E, Naray M, Morvai V. Effect of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal development of rats. *J Toxicol Environ Health* 2001; 62(5): 367-86.
20. Thrasher JD, Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health* 2001; 56(4): 300-11.
21. Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS, Ho HN. Mouse embryo toxicity of IL-6 in peritoneal fluids from women with or without endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 80(1):7-11.

تعیین مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی Nested-PCR در روستاهای شهرستان مرودشت، استان فارس

دکتر یاور راثی^{*}، مهندس مسعود محمدقاسمی^۱، دکتر عزت‌الدین جوادیان^۲، دکتر حسین معتضدیان^۳، مهندس سینا رفیع زاده^۴، مهندس عباس آقایی افشار^۵، دکتر جواد رفیع نژاد^۶ و مهندس مجید جلالی^۸

خلاصه

مقدمه: لیشمانیوز جلدی یک معضل مهم بهداشتی در بسیاری از مناطق ایران به شمار می‌رود. میزان بروز این بیماری طی دهه اخیر در جنوب ایران دو برابر شده است. بنابراین برای تعیین مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی در مناطق روستایی شهرستان مرودشت استان فارس، این مطالعه اپیدمیولوژیکی طی سال‌های ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ انجام گرفت.

روش: در این بررسی جمعاً ۱۲۶ سر جونده از سه روستای انتخابی با استفاده از تله‌های زنده‌گیر صید شدند و بعد از تهیه اسمیر و رنگ آمیزی با گیمسا از نظر وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت از روش Nested-PCR برای تعیین گونه انگل استفاده شد. همچنین ۲۰۰ عدد پشه خاکی با استفاده از اسپیراتور صید و جمع‌آوری شد و پس از تعیین گونه، استخراج DNA و PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: حیوانات صید شده شامل گونه‌های *Meriones libycus* (۷۵/۴٪)، *Cricetulus migratorius* (۱۴/۳٪) و *Microtus arualis* (۱۰/۳٪) بودند. نتایج Nested-PCR نشان داد که ۸/۴ درصد از جوندگان *M. libycus* آلوده به انگل *Leishmania major* می‌باشند. در بین پشه‌های جمع‌آوری شده، ۷۵٪ آنها گونه *Phlebotomus papatasi* بوده که ۲/۷٪ آنها آلوده به لیشمانیا مازور بودند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده از PCR در حدود ۲/۷ درصد گونه *P. papatasi* به طور طبیعی آلوده به انگل *L. major* بودند. این اولین گزارش در مورد اثبات گونه *P. papatasi* به عنوان ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی در استان فارس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مخزن، ناقل، لیشمانیوز جلدی، Nested-PCR، فارس، ایران

- ۱- دانشیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون - شیراز ۳- استاد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴- دانشیار انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۵- کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، اداره ژنتیک، مرکز مدیریت بیماری‌های تهران ۶- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۷- استادیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۸- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی کازرون - شیراز

* نویسنده مسؤل: گروه حشره‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران • آدرس پست الکترونیک: rassyi@sina.tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۱۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۲۳

مقدمه

در حال حاضر کانون‌های بسیاری از لیشمانیوز جلدی روستایی در استان فارس وجود دارد (۱۲،۱۳،۱۴). این کانون‌ها در سال‌های گذشته محدود به مناطق خاصی بوده ولی افزایش جمعیت، گسترش شهرها، احداث مناطق مسکونی در نزدیک کلنی جونندگان (مخازن بیماری) و ایجاد شهرک‌ها باعث دگرگونی وضعیت این بیماری در کشور و از جمله استان فارس شده است. امروزه در استان فارس، شهرستان‌های ارسنجان، نیریز و همچنین مرودشت با این معضل بهداشتی مواجه بوده، به طوری که در شهرستان مرودشت در سال ۱۳۷۹ تعداد موارد جدید ۴۶۵ نفر بوده و در سال ۱۳۸۰ با ۲۳/۸ درصد افزایش به ۵۶۷ نفر رسیده است (مکاتبه شخصی). در دیگر کانون‌های ایران مانند مناطق مرکزی ایران (اصفهان) جونده *Rhombomys opimus* در غرب و جنوب غربی کشور *Tatera indica* مخازن اصلی بیماری هستند و *Meriones libycus* نقش ثانویه را از نظر حفظ و نگهداری بیماری دارد (۶،۷،۹) و این در حالی است که در مناطق روستایی ارسنجان و نیریز استان فارس جونده *Meriones libycus* نقش اصلی و قطعی مخزن بیماری را ایفاء می‌کند (۱۲،۱۳،۱۴). در اغلب کانون‌های لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران، مانند کانون هیپراندمیک اصفهان پشه خاکی *P.papatasi* به عنوان ناقل اصلی بیماری گزارش شده است (۱۱،۱۶). از این گونه به همراه *P.caucasicus* برای اولین بار در ایران به روش ایزوآنزیم عامل بیماری *Lmajor* (zymodeme MON.26) جداسازی و تعیین هویت شده است (۱۷). لازم به توضیح است این روش علی‌رغم دقت بیشتر آن، دارای معایب متعددی می‌باشد که از آن جمله می‌توان نیازمندی به کشت تعداد زیاد انگل و آلودگی ایزوله‌های اولیه انگل را نام برد (۱۱). در حال حاضر روش‌های مولکولی این امکان را می‌دهد که گونه انگل لیشمانیا را با تعداد کم در نمونه‌های اولیه تعیین هویت کرد (۱).

بر این اساس، با توجه به بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر برای تعیین هویت گونه انگل لیشمانیا در مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی از روش Nested-PCR استفاده شده است. این پژوهش اولین تحقیق جهت تعیین ناقل قطعی ZCL به روش فوق‌الذکر در استان فارس می‌باشد.

روش بررسی

منطقه مورد مطالعه

این بررسی در سه روستای رجا آباد، قربان‌لک، و سلطان ولایت از بخش محمدآباد شهرستان مرودشت (۵۲) درجه و ۵۶ دقیقه شرقی و ۲۹ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی واقع در ۱۱ کیلومتری شهرستان مرودشت) انجام گرفت. ارتفاع این شهرستان ۱۵۹۵ متر از سطح دریا می‌باشد. در این منطقه هوا در طول تابستان گرم بوده (حداکثر ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و در زمستان سرد می‌باشد. اغلب مردم در روستاهای این شهرستان به شغل کشاورزی و دامداری مشغول هستند.

جمع‌آوری جونندگان و تهیه اسمیر از آنها

تعداد ۱۲۶ جونده طی ماه‌های پاییز سال ۱۳۸۲ و بهار و تابستان سال ۱۳۸۳ با استفاده از تله‌های زنده‌گیر جمع‌آوری شدند. هر ماه یک بار و هر دفعه ۲۰ عدد تله در نزدیکی لانه‌های فعال جونندگان نصب می‌شد. در این تله‌ها از خیار، گوجه فرنگی و گردوی بو داده به عنوان طعمه استفاده می‌شد. تله‌ها در دو نوبت صبح و عصر به کار گرفته می‌شدند.

جونندگان جمع‌آوری شده جهت تهیه اسمیر به آزمایشگاه ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون منتقل می‌شدند. پس از معاینه حیوانات، نمونه‌ها از موارد مشکوک اسمیر از ناحیه گوش و یا زخم‌های مشکوک روی پوست تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا زیر میکروسکوپ نوری برای وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار می‌گرفت.

در این مطالعه دو اسمیر مشابه از دو بیمار شامل یک دختر ۵ ساله از روستای قربان‌لک و یک پسر ۱۵ ساله از روستای رجا آباد تهیه گردید. برای شناسایی جونندگان از کلید اعتماد استفاده شد (۴).

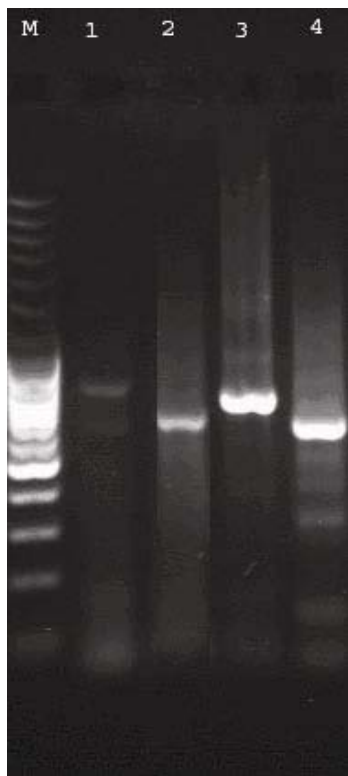
تعیین گونه انگل از اسمیرهای مثبت

پس از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت آماستیگوت موجود در روی لام‌ها (۲۸)، برای تعیین گونه انگل از روش Nested-PCR استفاده شد (۱۰). پرایمرهای استفاده شده شامل (GA CCC ACT GCA GAA GTA CGA) CSB1XR و (GTT AGA CGC TTT GAT CGC TTT ATT) CSB2XF

طبیعی آلوده به *Lmajor* مشاهده گردید (تصویر ۱). این اولین گزارش در مورد ردیابی انگل به طور مستقیم در گونه *P.papatasi* ناقل اصلی و قطعی عامل بیماری *Lmajor* به انسان می‌باشد. بررسی‌های اکولوژیکی روی این گونه نشان داد که این پشه خاکی فعالیت خود را در اوایل بهار شروع کرده و با یک اوج فعالیت در مرداد ماه در اواسط پاییز خاتمه می‌دهد.

جوندگان

در این مطالعه جمعاً ۱۲۶ جونده صید شدند. اگرچه بین جوندگان جمع‌آوری شده ۱۳ سر گونه *Microtus arvalius* و ۱۸ سر گونه *Cricetulus migratorius* صید شدند ولی فقط در ۸ سر از جونده‌های *M. libycus* (۴/۸٪) اجسام لیشمن مشاهده شد.



تصویر ۱: نتایج Nested-PCR بر روی *P.papatasi*

لاین ۱ و ۲ مربوط به سوش‌های به ترتیب *L. tropica* و *Lmajor* استاندارد، لاین M مربوط به مارکر، لاین ۴ مربوط به *P.papatasi* آلوده و لاین ۳ مربوط به *Linfantum* استاندارد می‌باشد.

(ACG برای روند اول و GCC AAC CAG TCG) LiR و (CCT و (G TGT GGT GGG ACT TGG AAA ATA)I3Z) برای دور دوم بودند. پرایمرهای استفاده شده از شرکت کالای طب شیراز تهیه شد.

سوش‌های مرجع (*Lmajor* (MHOM/IR/XX/LV 114) و *Ltropica* (MHOM/IR/89/ARD22)) به عنوان استاندارد انتخاب شد. این سوش‌ها از دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید.

جمع‌آوری پشه خاکی‌ها

پشه خاکی‌ها هر دو هفته یک بار در ماه‌های مرداد و شهریور سال ۱۳۸۳ از اماکن داخلی شامل اتاق خواب، توالت و اصطبل‌ها در روستاهای ذکر شده با استفاده از اسپراتور جمع‌آوری شدند.

در هر روستا به طور معمول سه مکان انتخاب و یک یا دو ساعت بعد از غروب آفتاب به مدت یک ساعت اقدام به جمع‌آوری پشه خاکی‌ها می‌شد. بیشترین و کمترین درجه حرارت و رطوبت محیط ثبت می‌شد. پشه خاکی‌های صید شده به آزمایشگاه منتقل شده و پس از قطع سر و انتهای بدن هر پشه خاکی، با استفاده از کلید معتبر تعیین گونه می‌شد (۱۵).

باقی‌مانده پشه خاکی که شامل سینه و قسمت اعظم شکم بود به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۵ درجه منتقل شده و برای استخراج DNA و انجام PCR آماده می‌گردید. به لام تهیه شده و میکروتیوب برچسب مشابه اختصاص داده می‌شد.

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA از پشه خاکی‌ها برای انگل *Lmajor* به روش Collins انجام گرفت (۲) و برای PCR از روش Noyes با پرایمرهای ذکر شده استفاده گردید (۱۰).

نتایج

پشه خاکی‌ها

مجموعاً ۲۰۰ عدد پشه خاکی صید شد. گونه‌های صید شده شامل *P. papatasi* (۷۵٪)، *P. sergenti* (۱۵٪) و *P. caucasicus* (۱۰٪) بودند. در بین پشه خاکی‌های صید شده ۴ عدد فلپوتوموس پاپاتاسی (۷/۲ درصد) به طور

هر موش آلوده حداقل دارای یک زخم در گوش و یا قاعده دم بود. آماستیگوت‌های مشاهده شده در جوندگان آلوده مشابه هم بود (تصویر ۲).

آلودگی انگلی در بین جانوران نر و ماده هر دو مشاهده گردید. در منطقه مورد مطالعه گونه *M. libycus* فعالیت روزانه داشته است. جمعاً ۲۶ اسمیر گرفته شده از جوندگان و ۲ اسمیر از اهالی منطقه مورد مطالعه، همگی به انگل لیشمانیا مازور آلوده بودند. برای مقایسه انگل جوندگان و انسان از انگل *L. major* استاندارد با طول باند ۶۵۰ bp و *L. tropica* با طول باند ۷۵۰ bp استفاده گردید (تصویر ۳).

بحث

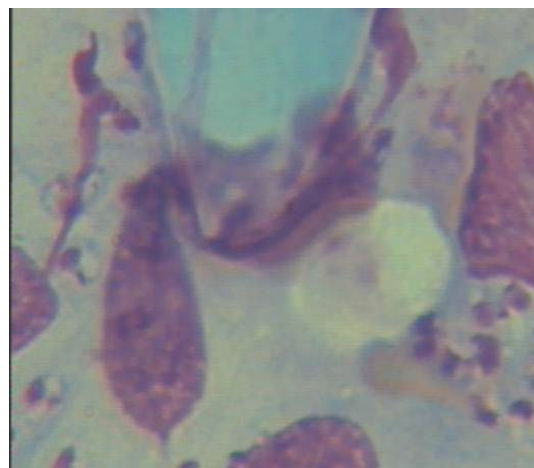
در این مطالعه استفاده از روش Nested-PCR اولین تلاش جهت ردیابی انگل *L. major* در گونه *P. papatasi* در استان فارس می‌باشد. به علاوه این اولین گزارش فلپوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقل قطعی و اصلی بیماری در این منطقه است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از روش Nested-PCR در مقایسه با روش ایزو آنزیم، بسیار سریع و حساس می‌باشد و با این روش به صورت مستقیم می‌توان عامل بیماری را از منبع اصلی و جمعیت وحشی پشه خاکی‌ها تعیین گونه نمود. از طرف دیگر روش ایزو آنزیم علی‌رغم دقت بیشتر آن، دارای معایبی می‌باشد که از آن جمله می‌توان نیازمندی به کشت تعداد زیاد انگل و احتمال آلودگی ثانویه ایزوله‌های اولیه انگل را نام برد (۱۱).

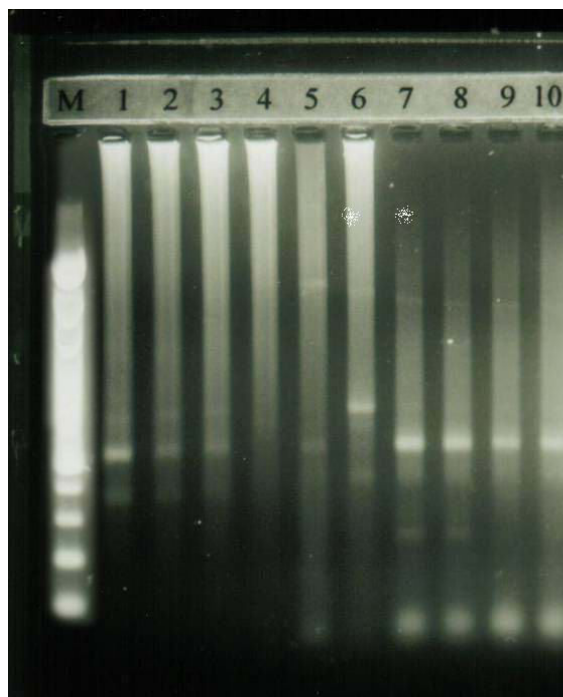
گونه *P. papatasi* به عنوان ناقل قطعی لیشمانیوز جلدی نوع روستایی از دیگر نقاط کشورمان مخصوصاً استان اصفهان نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۵).

مهم‌ترین یافته دیگر این تحقیق اثبات جوندگانه گونه *M. libycus* به عنوان مخزن اصلی و قطعی بیماری در مناطق روستایی مرودشت می‌باشد. این گونه از دیگر کانون‌های هم‌جوار منطقه مورد مطالعه ما یعنی شهرستان‌های ارسنجان و نیریز هم به عنوان مخزن اصلی گزارش شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴).

مرونیس لیبیکوس از کشورهای عربستان سعودی (۵) و ازبکستان نیز به عنوان مخزن لیشمانیوز جلدی روستایی



تصویر ۲: آماستیگوت‌های *L. major* از اسمیر گوش جوندگانه *Meriones libycus* که با گیمسا رنگ آمیزی شده است.



تصویر ۳: نتایج Nested-PCR بر روی *M. libycus* و نمونه‌های انسانی

لاین M مربوط به مارکر، لاین ۱ و ۶ مربوط به سوش‌های به ترتیب *L. tropica* و *L. major* مرجع، لاین‌های ۲-۳ و ۵ از اسمیر زخم یک انسان مبتلا به *L. major* لاین ۴ از اسمیر زخم یک انسان غیر از سالک، لاین‌های ۷، ۸، ۹ و ۱۰ از اسمیر گوش جوندگانه *M. libycus* آلوده به

L. major

شروع شده و تا استان فارس ادامه می‌یابد، که در این ناحیه گونه مریونس لیبکوس به عنوان مخزن اولیه بیماری بوده و فلبوتوموس پاپاتاسی نقش ناقل قطعی را ایفا می‌کند (۱۲،۱۴).

سپاسگزاری

بدین وسیله نهایت تشکر خود را از انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای حمایت مالی این طرح ابراز می‌دارد. همچنین از کارمندان ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون به خصوص آقای اسماعیل نجفی به دلیل همکاری در اقدامات صحرائی این طرح کمال امتنان را دارد.

گزارش شده است (۳). این گونه پراکنش وسیعی در مناطق مرکزی و جنوبی ایران دارد.

گونه *M.libycus* در مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران که ژریبل بزرگ *R.opimus* همچنین غرب و جنوب غربی ایران که ژریبل هندی *T.indica* نقش اصلی مخزن را دارند به عنوان مخزن ثانویه ایفای نقش می‌کند، بنابراین با در نظر گرفتن مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران (مخزن اصلی *R.opimus*)، غرب و جنوب غربی ایران (مخزن اصلی *T.indica*) و جنوب شرقی ایران مخزن اصلی بیماری *M.hurriinae* می‌باشد.

با توجه به نتایج این مطالعه در ایران یک منطقه دیگر هم در حال شکل گرفتن است که از جنوب استان اصفهان

Summary

Determination of Reservoir(s) and Vector(s) of Cutaneous Leishmaniasis by Nested-PCR in Marvdasht District, Fars Province, Southern Iran

Rassi Y., Ph.D.¹, Ghassemi MM., MSc.², Javadian E., Ph.D.³, Motazedian H., Ph.D.⁴, Rafizadeh S., M.Sc.⁵, Aghaie Afshar A., MSc.⁶, Rafinejad J., Ph.D.⁷, Jalali M., MSc.⁸

1. Associate Professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health and Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2. Master of Science in Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran & Health Research Center, Kazeroon, Shiraz, Iran. 3. professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 4. Associate Professor of Medical Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 5. Master of Science in Human Genetics, Tehran disease Control Center, Tehran, Iran. 6. Master of Science in Medical Entomology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 7. Assistant professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 8. Master of Science in Medical Entomology, Health research Center, Kazeroon, Shiraz, Iran.

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an increasing public health problem in several parts of Iran. In southern parts, the incidence of CL has been doubled over the last decade. This epidemiological study was done for determination of reservoir(s) and vector(s) of cutaneous leishmaniasis in rural regions of Marvdasht, Fars province, southern Iran during 2003 and 2004.

Methods: A total of 126 rodents were collected from three villages using live traps and their Giemsa-stained smears were studied for leishmania infection. After DNA extraction from positive smears, Nested-PCR was used for the identification of parasite species. In another procedure, 200 sand flies were collected by aspirator and after species identification DNA extraction and PCR was done.

Results: The collected samples included *Meriones libycus* (75.4%), *Cricetulus migratorius* (14.3%) and *Microtus arualis* (10.3%). Eight out of 95 *Meriones libycus* (8.4%) were found to be infected with *Leishmania major*. None of the other species were positive. Among the collected female sandflies 75% were identified to be *Phlebotomus papatasi* and 2.7% of them were found with *L.major* infection.

Conclusion: Only 2.7% of *Phlebotomus papatasi* were found naturally infected with *Leishmania major*. This is the first report of detection of *L.major* by Nested-PCR in *P.papatasi* as a proven principal vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Fars province, south of Iran.

Key words: Reservoir, Vector, Cutaneous leishmaniasis, Nested-PCR, Fars, Iran
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 134-139

References

- Alvar J and Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(Suppl.): S1-S250.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37(1): 37-41.
- Dejeux P. Information on the epidemiology and Control of the leishmaniasis, by country or territory. Geneva: World Health Organization, (document WHO/LEISH/91.30).
- Etemad I. Mammals of Iran. Vol 1.(Rodents and Identification Key), publication of national society for Environmental Conversation, 1978.
- Ibrahim EA, Mustafa MB, al Amir SA, al Seghayer SM, Hussein SM, Gradoni L. *Meriones libycus* (Rodentia:Gerbillidae) a possible reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Riyadh Province, Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(1): 39.
- Javadian E, Dehestani M, Nadim A, Rassi Y, Tahvildar-Bidruni Gh, Seyedi Rashti M.A., Shadmehr A. Confirmation of *Tatera indica* (Rodentia:Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the west of Iran. *Iranian J Publ Health* 1998; 27 (1-2): 55-60.
- Javadian E, Nadim A, Tahvidare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1976; 69(2): 140-3.
- Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA Extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96(1): 31-4.
- Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. II .The human disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62(4): 534-42.
- Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR based schizodeme method for identifying *leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2877-81.
- Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested-PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop* 2005; 93(1): 75-83.
- Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. *Meriones libycus* is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2006; 12(3-4): 474-7.
- Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH, Vatandoost H. Study on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Arsanjan county, Fars province, southern Iran. *Iranian J Publ Health* 2004; 33(1): 28-32.
- Rassi Y, Amin M, Javadian E, Motazedian H. Epidemiological studies on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Neiriz focus, Fars province, South of Iran (2001-2002). 6th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM6), 27-30, 2003; 102, No.178 Les Diablerets, Switzerland.
- Seyedi-Rashti MA, Nadim A. The genus *phlebotomus* (Dip: Psychodidae, phlebotominae) of the countries of the Eastern Mediterranean region. *Iranian J Publ Health* 1992; 21:11-50.
- Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. *Leishmania major* MON-26 isolated from naturally infected *Phlebotomus papatasi* (Dip:Psychodidae) in Isfahan province, Iran. *Acta Tropica* 1995; 59: 279-82.
- Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. The isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus* (*paraphlebotomus*) *caucasicus* in Isfahan province, Islamic Republic of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(5): 518-9.

تومورهای استخوانی پاتلا

دکتر سام حاج علیلو سامی^۱ و دکتر علی یگانه^{۲*}

خلاصه

مقدمه: پاتلا محل نادری برای بروز تومورهای اولیه و متاستاتیک استخوانی می باشد. ولی کندروبلاستوم و ژانت سل دو توموری هستند که در پاتلا بیشتر گزارش شده اند. نوع درمان و عمل جراحی براساس نوع و اندازه تومور متفاوت است. نتیجه و عملکرد زانو بعد از عمل جراحی به نوع تومور و روش درمان بستگی دارد. با توجه به نادر بودن تومورهای پاتلا مطالعات در این حوزه بسیار کم است.

روش: تعداد ۱۳ بیمار که از سال ۱۳۷۴ تا ۱۳۸۵ با تشخیص تومور پاتلا درمان شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه مقطعی و گذشته نگر مدارک رادیولوژیک، علایم بالینی و شواهد پاراکلینیک موجود در پرونده بیماران قبل و بعد از عمل و همچنین گزارش پاتولوژی آنها به منظور تعیین فراوانی تومورهای استخوانی، فراوانی علائم تومورهای استخوانی پاتلا و نتیجه درمان در تومورهای پاتلا در یک پی گیری بلند مدت مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از ۱۳ تومور، ۵ مورد کندروبلاستوم بود که فراوان ترین تومور پاتلا در این بررسی می باشد. در ۳ مورد تومور ژانت سل، در ۲ مورد متاستاز از دیگر نقاط، ۲ مورد کیست آنوریسمال (ABC: Aneurysmal bone cyst) و یک مورد کیست ساده استخوان (UBC: unicameral bone cyst) وجود داشت. در تومورهای پاتلا درد و افیوژن زانو فراوان ترین علامت مشاهده شده بود. یک مورد عود با حفظ پاتلا وجود داشت. پس از عمل جراحی با حفظ پاتلا محدوده حرکتی زانو و قدرت عضله چهارسرانی بهتر از موارد عمل جراحی برداشتن کامل پاتلا است.

نتیجه گیری: در بین بیماران مورد مطالعه فراوان ترین تومور پاتلا کندروبلاستوم و پس از آن ژانت سل تومور بود. با توجه به بهتر بودن محدوده حرکتی زانو و قدرت عضله چهارسرانی پس از جراحی با حفظ پاتلا نسبت به موارد پاتلکتومی شده در این بیماران جراحی با حفظ پاتلا توصیه می شود.

واژه های کلیدی: تومورهای پاتلا، کندروبلاستوم، ژانت سل، تومور

۱- استادیار ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران ۲- دستیار ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران

* نویسنده مسؤول: بیمارستان شفا یحیایان، تهران • آدرس پست الکترونیک: yeganeh1354@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۴ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۱۹

مقدمه

پاتلا از استخوان‌های سزاموئید بدن است که نقش آن در بدن تقویت قدرت عضله چهار سر رانی می‌باشد (۹). این استخوان محل شایعی برای تومورهای استخوانی نیست (۱،۹) و تا کنون برای هیچ تومور استخوانی اولیه، ثانویه یا متاستاتیک به عنوان محل شایع نام برده نشده است. در اکثر مطالعات گذشته ژانت سل تومور به عنوان شایع‌ترین تومور پاتلا معرفی شده است (۱۱) ولی در چند مطالعه دیگر کندروبلاستوما شایع‌تر بوده است (۵). علائم تومورهای پاتلا متنوع بوده و درد قدام زانو، کاهش محدوده حرکت زانو، تورم، قرمزی و... از علائم شایع می‌باشند (۱۲-۱).

تشخیص این ضایعات بررسی پاراکینیک و رادیولوژیک پاتلا الزامی است و نوع درمان این تومورها براساس نوع تومور تفاوت دارد. در درمان تومورهای پاتلا اگر ضایعه همه پاتلا را گرفته باشد و یا بدخیم باشد باید کل پاتلا را برداشت (۱،۵،۹). در مطالعه حاضر با معرفی ۱۳ مورد فراوانی تومورهای پاتلا، فراوانی علائم آنها و نتیجه درمان آنها در یک پیگیری بلند مدت بررسی شده است. به علت نادر بودن تومورهای پاتلا اکثر قریب به اتفاق مطالعات گذشته گزارش‌های موردی از تومورهای پاتلا می‌باشند (۱۲-۱، ۸-۲).

جدول ۱: مشخصات بیماران بر حسب سن و جنس، نوع تومور و نوع درمان انجام شده

ردیف	سن و جنس	نوع تومور	نوع درمان
۱	۱۸ ساله (مرد)	کندروبلاستوم	پاتلکتومی پارشیل
۲	۱۶ ساله (مرد)	ABC ^۱ ثانویه	پاتلکتومی ساب توتال
۳	۲۲ ساله (زن)	GCT ^۲	کورتاژ و سیمان
۴	۲۸ ساله (زن)	GCT ^۲	کورتاژ و سیمان
۵	۳۲ ساله (مرد)	GCT ^۲	پاتلکتومی ساب توتال
۶	۶۰ ساله (مرد)	متاستاز	پاتلکتومی کامل
۷	۴۲ ساله (مرد)	متاستاز ^۳ RCC	پاتلکتومی کامل
۸	۱۶ ساله (زن)	UBC ^۴	کورتاژ و گرافت استخوان
۹	۲۸ ساله (مرد)	ABC ^۱	کورتاژ و گرافت استخوان
۱۰	۱۹ ساله (زن)	کندروبلاستوم	پاتلکتومی پارشیل
۱۱	۱۷ ساله (زن)	کندروبلاستوم	پاتلکتومی پارشیل
۱۲	۱۴ ساله (مرد)	کندروبلاستوم	کورتاژ با سیمان
۱۳	۱۵ ساله (مرد)	کندروبلاستوم	کورتاژ با سیمان

۱. Aneurysmal bone cyst: کیست آنوریسمال استخوان

۲. Giant cell tumor: تومور سلول ژانت

۳. Renal cell carcinoma: کارسینوم سلول کلیه

۴. Unicameral bone cyst: کیست یک حفره‌ای استخوان

روش بررسی

مطالعه حاضر یک بررسی گذشته‌نگر مقطعی است که در آن ۱۳ بیمار که بین سال‌های ۱۳۷۴ تا ۱۳۸۵ با تومور پاتلا مراجعه و درمان شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران مورد مطالعه همگی تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند. تشخیص قطعی قبل از عمل با علائم بالینی و بررسی‌های رادیولوژیک داده شده بود. در یک مورد قبل از عمل جراحی نمونه‌برداری باز (Incisional biopsy) انجام شده و ۲ هفته بعد جراحی درمانی انجام شده بود. یک مورد هم هنگام عمل جراحی نمونه برداری مقطعی (Frozen section) انجام شده بود که به علت بدخیمی بر اساس گزارش پاتولوژی، پاتلا به طور کامل خارج شده بود. در عمل جراحی در تمام موارد نمونه‌برداری انجام شده و یا کل پاتلا خارج شده و برای بررسی آسیب‌شناسی ارسال شده بود. تشخیص‌های ثبت شده بر اساس گزارش آسیب‌شناسی می‌باشد. تاریخچه بیمار، نوع عمل جراحی، مدارک رادیولوژیک و گزارش پاتولوژی از پرونده بیماران جمع‌آوری و بررسی شد. سپس بیماران برای ارزیابی فراخوانده شدند و ضمن بررسی رادیولوژیک از نظر عود ضایعه نتیجه عمل جراحی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. دو بیمار طی ۶ ماه گذشته و بقیه بین یک تا ده سال پیش عمل شده بودند. بنابراین پی‌گیری طولانی مدت متوسط ۵ ساله انجام شد. بیماران از نظر درد و ناراحتی مورد سوال قرار گرفتند. سپس دامنه حرکت زانو و قدرت اکستنشن به عنوان توان عضله چهار سررانی و پایداری پاتلا ارزیابی شد. پایداری پاتلا با استفاده از تست‌های کلینیکی patella gliding و patella grinding، thumb pressure بررسی شد. زانو از لحاظ تورم و افوزیون معاینه و همه اطلاعات بیماران ثبت گردید.

نتایج

از ۱۳ بیمار مورد مطالعه همگی جراحی شده بودند که در یک مورد پس از جراحی اولیه بیماری عود کرده بود و ۳ سال بعد پاتلای بیمار به طور کامل برداشته شد. بقیه

بیماران یک بار عمل شده بودند که بر اساس نوع تومور عمل جراحی آنها متفاوت بود. سن و جنس و نوع عمل جراحی بیماران در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

از ۱۳ بیمار ۵ مورد کندروبلاستوم داشتند که شایع‌ترین تومور در بین انواع تومورها می‌باشد. در ۳ مورد تومور سلول‌های ژانت بود که یک مورد پس از کورتاژ و سیمان گذاشتن ۳ سال بعد عود مجدد داشته که مجدداً جراحی و پاتلکتومی انجام شده بود.

۲ مورد کیست آنوریسمال استخوانی داشتند که یک مورد ثانوی به کندروبلاستوم و یک مورد اولیه بود. در هر دو مورد در MRI بیماران سطح مایع دیده می‌شد.

یک مورد کیست ساده استخوانی (UBC) داشت که به دلیل دردناک شدن جراحی شده بود. در بین بیماران بدخیمی اولیه استخوان پاتلا وجود نداشت.

در دو مورد از این بیماران متاستاز از تومور نواحی دیگر بدن در پاتلا ایجاد شده بود که در یک مورد منشأ اولیه شناخته نشده و یک مورد هم متاستاز از کارسینوم سلول‌های کلیه بود.

در تمام موارد درد جلو زانو وجود داشت که فراوان‌ترین علامت زمان مراجعه محسوب می‌شود. از این ۱۳ مورد ۱۲ مورد افیوژن زانو داشتند که البته میزان آن متفاوت بود (شکل ۱).



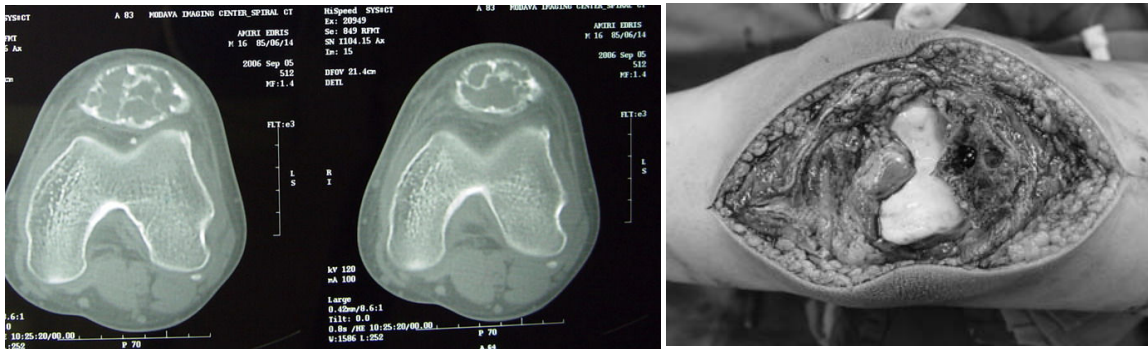
شکل ۱: فتوگرافی از زانوی سمت چپ بیمار مبتلا به GCT



شکل ۲: رادیوگرافی بیمار مبتلا به کندروویلاستوم

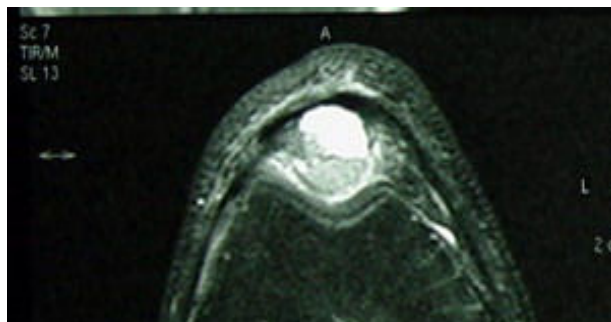
سمت چپ: AP و لترال

سمت راست: نمای پاتالار



شکل ۳: فتوگرافی حین جراحی بیمار مبتلا به کندروویلاستوم (سمت راست)

نمای آگزیکال سی تی اسکن همان بیمار (سمت چپ)



شکل ۴: MRI نمای آگزیکال از پاتالای بیمار مبتلا به ABC

نداشت ولی میزان رضایت بیماران کمتر از رضایت بیماران با عمل جراحی با حفظ پاتالا بود. دو مورد از این بیماران که پارشیال پاتالکتومی شده بودند نیمه دررفتگی پاتالا پیدا کردند.

بحث

در بررسی مقالات تنها چند مقاله در مورد تومور پاتالا با تعداد بیماران محدود وجود دارد و علت کم بودن تعداد بیماران در مطالعه حاضر نیز به همین دلیل است. مطالعه‌ای در مورد تومور پاتالا تاکنون در ایران انجام نشده است و نویسندگان در بررسی ۱۰ ساله چندین مرکز تومورهای استخوانی تهران موفق به یافتن ۱۳ بیمار شدند. در اکثر گزارش‌های قبلی شایع‌ترین تومور ژانت معرفی شده است (۱) ولی در مطالعه حاضر و مطالعه‌ای دیگر (۱۲) شایع‌ترین تومور کندروبلاستوم بوده است. موارد کیست آنوريسمال استخوانی ثانویه تومورهای پاتالا در حد گزارش موردی بوده‌اند (۶). یک مورد ABC ثانویه روی کندروبلاستوم در مطالعه حاضر نیز وجود داشت. یک مورد نیز ABC اولیه بود که در MRI بیمار کاملاً مشخص بود (شکل ۴) در ABC وجود سطح مایع مایع در MRI پاتوگونومونیک می‌باشد (۸،۹،۶ و ۴-۱).

کندروبلاستوم از تومورهای خوش خیم مهاجم می‌باشد. فراوان‌ترین محل بروز آن پروگزیمال استخوان‌های بلند است و شایع‌ترین سن بروز قبل از بسته شدن اپی‌فیزها می‌باشد (۱۲، ۹، ۵، ۱). پاتالا محل شایعی برای آن نیست و درمان ترجیحی آن در پاتالا حفظ پاتالا و کورتاژ با یا بدون سیمان می‌باشد (۱۲، ۵) ولی هر توموری که سطح مفصلی پاتالا را تخریب کند در صورت حفظ آن زانو را دچار عارضه دژنراسیون زود رس خواهد کرد. تومور سلول‌های ژانت در پروگزیمال استخوان‌های بلند و دیستال فمور دیستال رادیوس شایع است. سن بروز آن بعد از بسته شدن اپی‌فیز می‌باشد و پاتالا محل شایعی برای درگیری نیست (۱۱، ۹، ۱). درمان شبیه به موارد کندروبلاستوم می‌باشد.

فقط ۷ نفر از مجموع ۱۳ بیمار محدودیت در حرکت زانو داشتند که ۴ نفر محدودیت آنها بیشتر بود (متوسط دامنه حرکتی = ۵۰ درجه).

بعد از عمل جراحی ۵ مورد نیمه‌دررفتگی (subluxation) پاتالا و یا لغزش (gliding) غیرطبیعی پاتالا داشتند. یک مورد تومور متاستاتیک زانو ظاهر اریتماتو داشت و در بقیه موارد رنگ پوست طبیعی به نظر می‌رسید.

در مطالعه اخیر نوع عمل جراحی بر اساس میزان درگیری غضروف مفصلی بود یعنی در مواردی که سطح مفصلی نامنظم بوده (در رادیوگرافی و سی‌تی‌اسکن) پاتالکتومی انجام شده است (شکل ۲) ولی تصمیم نهایی در این مورد حین عمل جراحی گرفته شده بود (شکل ۳). برای ارزیابی غضروف مفصلی پاتالا از MRI استفاده شده است.

در موارد تومور کندروبلاستوم یا ژانت سل تومور (GCT) کورتاژ با سیمان یا پاتالکتومی انجام شده بود. در یک مورد با کیست ساده استخوان کورتاژ ساده با گرافت استخوانی انجام شده بود.

هر دو مورد متاستاتیک پاتالکتومی کامل شده بودند. یک مورد کارسینوم سلول کلیه (RCC) را نشان داد و یک مورد هم متاستاز با منشأ ناشناخته (Metastas with unknown origin) که به انکولوژیست معرفی شدند.

در مواردی که پاتالا برداشته نشده بود، بیمار از نظر قدرت عضله چهار سر رانی بعد از عمل و محدوده حرکت زانو وضعیت بهتری داشت. در ۶ مورد کورتاژ ساده یا همراه سیمان انجام شده بود که میانگین محدوده حرکت این موارد ۱۰۵ درجه بود (بین ۸۰ تا ۱۲۵). قدرت عضله چهارسر رانی بعد از عمل در ۵ مورد طبیعی و در یک مورد ۴/۵ بود. یکی از موارد تومور GCT بعد از ۳ سال عود کرده بود که پاتالکتومی انجام شده بود. در مجموع ۷ مورد پاتالکتومی شده بودند که ۳ مورد بطور کامل و ۴ مورد ساب توتال یا پارشیال بود. متوسط محدوده حرکتی زانو در این موارد ۷۰ درجه (بین ۵۰ تا ۱۰۰) بود و مورد عود وجود

فemor دیده می‌شود (۱،۹،۱۲) و درمان آن فقط زمانی لازم است که علامت‌دار بوده یا استخوان اندام تحتانی را تهدید به شکستن نماید. در یک مورد از بیماران مطالعه حاضر درد باعث جراحی بیمار شده بود.

شایع‌ترین تومورهای بدخیم که به استخوان متاستاز می‌دهند. تومورهای ریه، پروستات، سینه، کلیه و... می‌باشند. در برخی از موارد محل اولیه متاستاز مشخص نمی‌شود که در این صورت کلیه و ریه شایع‌ترین محل ناشناخته تومور اولیه خواهند بود (۱،۹). یک مورد از بیماران مطالعه حاضر از این دسته بود که با تشخیص کارسینوم متاستاتیک پاتالا بعد از جراحی برداشتن پاتالا به انکولوژیست برای شیمی درمانی معرفی شده بود.

کارسینوم سلول کلیه (Renal cell carcinoma) از مواردی است که می‌تواند به استخوان متاستاز بدهد و از تومورهای مقاوم به رادیوتراپی و شیمی درمانی است (۱،۵،۹،۱۱،۱۲). یک مورد از بیماران مطالعه حاضر پس از جراحی پاتالکتومی به ارولوژیست معرفی شده بود.

کیست آنورسیمال استخوان بیشتر متافیز استخوان‌های بلند را درگیر می‌کند که در پاتالا گزارش‌های متعدد وجود دارد (۱،۶-۸،۹،۱۱،۱۲). Wolf در مطالعه خود در مورد بررسی موارد تومورهای پاتالا شایع‌ترین تومور را کندروبلاستوم معرفی کرده است و در زمینه درمان توصیه نموده است تا حد امکان پاتالا حفظ شود (۱۲). در تومورهای بدخیم در برداشتن وسیع ضایعه تومورال (wide resection) لازم است حاشیه تومور نیز برداشته شود. در بیماران مطالعه حاضر در ۲ مورد بدخیم ۱cm اطراف پاتالا نیز برداشته شده بود و در پی‌گیری ۲ ساله و ۴ ساله علائمی از عود دیده نشد.

بعد از برداشتن پاتالا برای بازسازی عضله چهارسر بعد از جراحی بیمار راه‌های مختلفی را پیشنهاد کرده‌اند. Machens و همکاران از فلاپ آزاد لاتیسیموس دورسی استفاده کرده‌اند (۷). در مواردی بعد از برداشتن قسمت اعظم پاتالا از یک سطح مصنوعی استفاده شده است (۱۰). در بیماران مطالعه حاضر بازسازی برای بیماران انجام نشده بود.

کیست ساده استخوانی بیشتر در دهه اول زندگی و گاهی در دهه دوم در پروگزیمال استخوان هومروس و

Summary

Patellar Bone Tumors

Hajaliloo Sami S., MD.¹, Yeganeh A, MD.²

1. Assistant Professor of Orthopedics, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran 2. Resident of Orthopedics, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Introduction: Primary and metastatic bone tumors are rare in patella bone. Chondroblastoma and giant cell tumor have been reported in patella more frequently than others. Treatment and post surgical knee function depend on the type of tumor and surgical procedure. Regarding the scarcity of patellar tumors there are little reports about it.

Method: In this retrospective cross-sectional study, 13 patients with patella tumor treated from 1995-2006 were studied. Radiologic findings, clinical symptoms, pathologic reports and surgical outcomes were obtained from patients' profiles. The frequency of patella bone tumors and their symptoms as well as surgical outcomes were evaluated in a long term follow up.

Results: The most frequent patella tumor was chondroblastoma (5 cases of 13) followed by giant cell tumor (3 cases), metastasis (2 cases), aneurism small bone cyst (2 cases) and simple bone cyst (1 case). Knee pain and effusion were the most common symptoms. Knee range of motion and quadriceps strength and function

were better in patella saving procedures comparing to total patellectomy. There was one case of recurrence in patients underwent patella saving operation.

Conclusion: In our patients, chondroblastoma and giant cell tumor were respectively the most frequent patella tumors. Since knee range of motion and quadriceps strength and function have been better in patella saving procedures compared to patellectomy cases, this procedure is recommended in the treatment of patients with patella tumors.

Key words: Patellar tumors, Chondroblastoma, Giant cell tumor

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 140-146

References

1. Blabach J.A: primary bone tumors. In: Mira S (editor), Bone tumors. 2nd ed., Philadelphia, Saunders Co., 1989; pp150-250.
2. Castro MD, Irwin RB. Aneurysmal bone cyst of the patella. *Am J Orthop* 1996; 25(10):717-9. Review.
3. Cooper ME, Mess D. Isolated skeletal metastasis to the patella. *Am J Orthop* 2000; 29(3): 210-2.
4. Desnoyers V, Charissoux JL, Aribit F, Arnaud JP. [Aneurysmal bone cyst of the patella. A case report and literature review]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2000;86(6): 616-20. Review.French.
5. Ghekiere J, Geusens E, Lateur L, Samson I, Sciot R, Baert AL. Chondroblastoma of the patella with a secondary aneurysmal bone cyst. *Eur Radiol* 1998;8(6):992-5.
6. Kransdorf MJ, Sweet DE. Aneurysmal bone cyst: concept, controversy, clinical presentation, and imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1995;164(3): 573-80. Review.
7. Machens HG, Siemers F, Kaun M, Krapohl B, Reichert B, Russlies M, *et al.* Patellar tendon reconstruction using a free latissimus dorsi flap following resection of a prepatellar myxofibrosarcoma: case report. *J Reconstr Microsurg* 2005; 21(4):235-8.
8. Marudanayagam A, Gnanadoss JJ. Secondary aneurysmal bone cyst of the patella: a case report. *Iowa Orthop J* 2006; 26: 144-6.
9. Robert K., Heck, GR, Peter G: Bony tumor. In: Canal S.T. (chief editor), Campbell's operative Orthopedics, 10th ed., Philadelphia, Mosby, 2003; pp500-550.
10. Schwab JH, Agarwal P, Boland PJ, Kennedy JG. Patellar complications following distal femoral replacement after bone tumor resection. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(10): 2225-30.
11. Wang IC, Shih HN, Hsueh S, Hsu RW. Giant-cell tumor of the patella: report of two cases. *Changeng Yi Xue Za Zhi* 1998; 21(3): 338-42.
12. Wolfe MW, Halvorson TL, Bennett JT, Martin PC. Chondroblastoma of the patella presenting as knee pain in an adolescent. *Am J Orthop* 1995; 24(1):61-4.

بررسی مجوزهای سقط جنین صادر شده در اداره کل پزشکی قانونی استان کرمان در سال

۱۳۸۴ و مقایسه اجمالی با سال‌های قبل

دکتر مسعود قادی پاشا^{۱*} و دکتر زهرا امینیان^۲

خلاصه

مقدمه: با صدور مجوز سقط جنین در موارد بیماری‌های جنین که با فتوای مقام معظم رهبری عملی شد، تحولی اساسی در سقط جنین درمانی صورت گرفت. هدف از این مطالعه بررسی موارد صدور مجوز سقط جنین درمانی در کرمان طی یک سال و نیز مقایسه اجمالی آن با سال‌های گذشته است. هدف نهایی افزایش میزان آگاهی کادر پزشکی و درمانی در مورد اندیکاسیون‌های سقط درمانی و زمان انجام آن و پاسخ به سؤالات و آشنایی با مجازات‌های سقط جنین جنایی با دیه جنین است.

روش: در این مطالعه مقطعی کل زنان بارداری که در سال ۱۳۸۴ جهت دریافت مجوز سقط درمانی به مرکز پزشکی قانونی کرمان مراجعه کردند، مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به این زنان در پرسشنامه منظور گشت و اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: از ۴۷ مراجعه کننده در طول یک سال به ۲۴ نفر مجوز داده شد. از میان ۲۴ مجوز، ۶۸ درصد به علت بیماری و ناهنجاری‌های جنین و ۳۲ درصد به علت بیماری‌های مادر صادر گردید. مهم‌ترین بیماری در جنین‌ها بتاتالاسمی ماژور و در مادران بیماری‌های قلبی عروقی بود. میانگین سن مادران در زمان سقط ۲۹ سال و میانگین سن جنین آنان ۱۷ هفته بود.

نتیجه‌گیری: با افزایش موارد مجوز سقط جنین درمانی از آمار سقط‌های غیرقانونی کاسته خواهد شد و این خود باعث افزایش سلامت زنان باردار می‌گردد لذا با افزایش میزان آگاهی کادر پزشکی از موارد مجاز سقط درمانی و قوانین مربوط به آن و نیز مجازات‌های سقط جنین جنایی می‌توان به سلامت جامعه زنان باردار کمک شایانی نمود. با آشنایی به قوانین و مقررات و بخشنامه‌های سقط جنین درمانی از مشکلات متخصصین زنان و زایمان نیز در این زمینه کاسته می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سقط جنین، سقط درمانی، سقط جنایی، پزشکی قانونی

۱- استادیار پزشکی قانونی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- پزشک عمومی، اداره کل پزشکی قانونی استان کرمان

* نویسنده مسؤول: دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک:

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۱۲/۵ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۲/۲ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۲۳

مقدمه

سقط جنین به ختم حاملگی قبل از هفته ۲۰ حاملگی یا زمانی که جنین کمتر از ۵۰۰ گرم وزن دارد، گفته می‌شود (۹).

اهمیت سقط ازدیدگاه پزشکی قانونی در بررسی و تفکیک موارد زیر است:

۱- سقط جنین خودبه‌خودی

۲- سقط جنین درمانی

۳- سقط جنین جنایی

۴- سقط جنین‌های ناشی از ضربه (۷)

هر سه دقیقه یک زن به علت اقدام به سقط عمدی جان خود را از دست می‌دهد. مرگ و میر ناشی از سقط‌های عمدی عمدتاً در کشورهایی اتفاق می‌افتد که انجام سقط غیرقانونی است. صرف‌نظر از وضعیت قانونی و اخلاقی و فرهنگی در همه جوامع زنانه هستند که برای خاتمه حاملگی ناخواسته خود اقدام به سقط می‌نمایند (۱۱).

در ایران انجام سقط در مواردی که جان مادر در معرض خطر باشد و یا ناهنجاری شدید جنین قطعی بوده و با حیات پس از تولد منافات داشته و یا منجر به حرج مادر شود، مجاز است (۴). اگرچه در بسیاری از کشورها ختم طبی حاملگی (سقط درمانی) قانونی است ولی هنوز هم در نقاط وسیعی از دنیا هر نوع سقطی ممنوع است (به طور کامل یا با استثنای حفظ جان مادر) و حتی در نقاطی که امکان ختم حاملگی هم وجود دارد سقط جنایی هنوز هم به ندرت انجام می‌شود (۱۰).

قبل از پیروزی انقلاب در بخش قانون مجازات عمومی حقوق ایران در مبحث مربوط به قتل و ضرب و جرح عمدی مقررات حاکم بر مسئله سقط بدون توجه به منابع فقهی و موازین اسلامی تدوین شده بود ولی پس از پیروزی انقلاب اسلامی ضوابط قانونی حاکم بر سقط جنین بر اساس موازین اسلامی مورد تجدید نظر قرار گرفت و تغییرات عمده‌ای نمود. مهم‌ترین منبع در این مورد قرآن کریم است به طوری که در آیات ۱۲ تا ۱۵ سوره مؤمنون مراحل حیات جنین مورد تأکید قرار گرفته است (۶). امام خمینی

و علامه حلی نیز در کتب تحریرالوسیله جلد ۲ و تبصره‌المعلمین، مراحل رشد جنین و مجازات‌های هر مرحله را بیان نموده‌اند (۵، ۳).

بر اساس این منابع برای متوقف کردن هر مرحله از حیات جنین دیه معین تعیین شده به طوری که پس از چهار ماه دیه سقط جنین مذکر معادل یک دیه کامل انسان و دیه سقط جنین مؤنث نصف دیه کامل است و برای جنین کمتر از چهار ماه بر اساس سن جنین دیه معین برقرار شده است (۲). در قوانین تعزیرات حکومتی مواد ۶۲۲ تا ۶۲۴ مجازات سقط جنین عمدی مشخص شده به طوری که اگر فردی شاغل در یکی از حرف پزشکی و پیراپزشکی اقدام به سقط جنین نماید و یا مباشرت به سقط نماید به حبس از ۲ تا ۵ سال و حکم به پرداخت دیه محکوم خواهد شد (۱۸). لذا با توجه به مقررات فوق قوانین لازم برای موارد مجاز سقط درمانی صادر شد که شامل موارد زیر می‌باشد:

- ادامه بارداری توأم با خطر جانی برای مادر باشد و یا بیماری جنین با ادامه حیات جنین پس از تولد منافات داشته باشد و یا این بیماری منجر به حرج مادر گردد و به تأیید سه متخصص برسد.

- کورتاژ قبل از ولوج روح صورت گیرد (۴ ماهگی).

- نظر زن و شوهر و اظهارنظر پزشکی قانونی مبنی بر ختم حاملگی باشد.

خود عمل کورتاژ برای مادر خطر بیشتری نداشته باشد (۱، ۴).

باید دانست که برای انجام سقط درمانی رضایت زن و شوهر لازم است اما اگر شوهر به هر دلیلی رضای نباشد و قطع بارداری برای نجات مادر باشد، رضایت وی مطرح نیست حتی اگر مادر متوجه وخامت حال خود نباشد و حاضر به سقط طبی نباشد، با نظر متخصص و تأیید پزشکی قانونی اقدام خواهد شد. در موارد اورژانس نیاز به رضایت و تأیید پزشکی قانونی نیست و پزشک متخصص می‌تواند سقط درمانی را با شرایطی که اعلام شد، انجام دهد. لازم به ذکر است در موارد غیراورژانس با درخواست زوجین در مرکز پزشکی قانونی بررسی‌ها شروع می‌شود (۷). یکی از

دسته‌بندی شد و شیوع سنی مراجعین و جنین آنها ارزیابی شد.

نتایج

در این مطالعه از ۴۷ نفر مراجعه کننده به ۲۴ نفر مجوز سقط درمانی داده شد.

(۱) میانگین سن مراجعین ۲۹ سال با حداقل ۱۶ و حداکثر ۴۲ سال بود. در مادر ۱۶ ساله جنین آنسفال بود و مادر ۴۲ ساله مبتلا به بیماری قلبی پیشرفته بود.

(۲) میزان تحصیلات مراجعین اغلب زیردیپلم (۶۰ درصد) و بالاتر از دیپلم تا لیسانس (۳۰ درصد) و مابقی در حد لیسانس و بالاتر بود.

(۳) در بررسی شغل ۸۲ درصد خانه‌دار و ۱۸ درصد شاغل و کارمند بودند.

(۴) میانگین هفته بارداری در درخواست‌ها ۱۷ هفته بارداری بود. کمترین آن ۸ هفته و بالاترین ۲۶ هفته بود که در مورد اخیر به دلیل ولوج روح مجوز صادر نشد.

(۵) شایع‌ترین علل مراجعه بیماری‌های مادر (۵۲ درصد) و در درجه دوم بیماری‌های جنین (۴۸ درصد) بود ولی شایع‌ترین علت صدور مجوز بیماری بتاتالاسمی ماژور جنین (۵۴ درصد) و در درجه دوم بیماری قلبی پیشرفته مادر (۱۷ درصد) بود. سایر بیماری‌های مادر مانند بیماری‌های کلیه، پسروریزیس، پمفیگوس و صرع ۱۵ درصد و سایر بیماری‌های جنین نظیر آنسفال ۱۴ درصد موارد را شامل می‌شد.

(۶) برای ۲۳ نفر که مجوز صادر نشد، شایع‌ترین علت عدم مراجعه به موقع بود (سن حاملگی بالای ۴ ماه) و در درجه دوم بیماری و ناهنجاری‌هایی که اهمیت زیادی نداشت مانند جنین شش انگشتی و یا حاملگی ناخواسته مادر بدون مشکلات روحی و روانی شدید و با جنین کاملاً سالم.

بحث

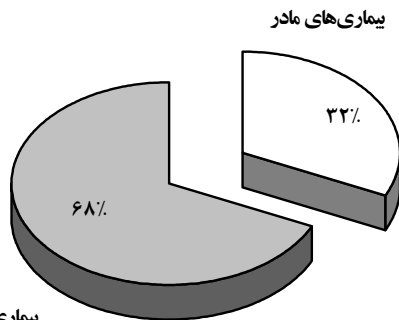
براساس این مطالعه از علل جنینی، بتاتالاسمی ماژور و از علل بیماری‌های مادری، بیماری‌های قلبی - عروقی سرده‌

مشکلات جامعه پزشکی عدم آشنایی با مراحل و موارد سقط جنین درمانی قانونی است. اگر مادری دچار بیماری باشد و ادامه بارداری باعث خطر جانی برای وی شود و پس از ۴ ماهگی مراجعه کند، می‌توان مادر را تحت نظر قرار داد و در صورت نیاز اقدام درمانی زودرس برای نجات جان مادر را انجام داد ولی اگر نقص ژنتیک در جنین وجود داشته باشد و پس از ۴ ماهگی مادر مراجعه کند، به هیچ عنوان نمی‌توان سقط درمانی را انجام داد. در موارد تجاوزات جنسی و حاملگی‌های نامشروع نیز نمی‌توان مجوز سقط درمانی را صادر نمود (۴). مطالعه حاضر به منظور بررسی موارد صدور مجوز سقط درمانی در سال ۱۳۸۴ در اداره پزشکی قانونی کرمان صورت گرفت.

روش بررسی

این بررسی از نوع مقطعی بود و جمعیت مورد مطالعه کل زنان بارداری بودند که جهت دریافت مجوز سقط درمانی در سال ۱۳۸۴ به مرکز پزشکی قانونی کرمان مراجعه کردند. متغیرهای دموگرافیک و مامایی و بیماری مادر و جنین بررسی و برای هر بیمار توسط پزشک معاینه کننده در پرسشنامه ثبت شد. تعداد مراجعین ۴۷ نفر بود این مراجعین با در دست داشتن نامه قضایی یا درخواست شخصی به مرکز مراجعه می‌نمودند. سپس از زن باردار معاینه لازم و اولیه انجام می‌شد و مدارک بیماری وی بررسی می‌شد و در صورت نیاز به معاینات و اقدامات پاراکلینیکی بیشتر به متخصصین مربوطه در بیمارستان‌های معتبر دانشگاهی ارجاع می‌شد و با نظر سه متخصص و پس از مشورت‌های لازم مجوز سقط درمانی قبل از ولوج روح صادر می‌شد. در مورد بیماری‌های جنین به خصوص بتاتالاسمی ماژور از طریق CVS (chorionic villus sampling) در مراکز ژنتیک معتبر اقدام می‌شد و گاهی این زنان از طریق متخصصین زنان ارجاع می‌شدند. پس از پایان زمان مطالعه نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS توصیف شد. داده‌ها بر اساس نوع بیماری مادر و یا نوع ناهنجاری‌های جنین

قبل از ۴ ماهگی به پزشکی قانونی ارجاع شوند و تأیید سقط درمانی را دریافت نمایند تا در کنترل این بیماری مؤثر باشد. لازم به ذکر است که امکان صدور مجوز سقط در مورد تجاوز وجود ندارد مگر آنکه در چهارچوب قوانین اعلام شده باشد.



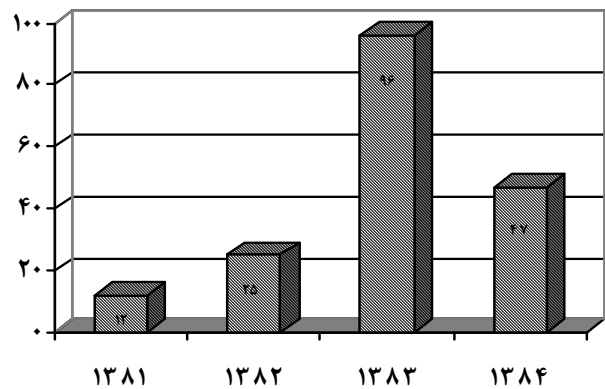
بیماری‌های جنین

نمودار ۲: مقایسه آماری علل مجوزهای صادر شده برای سقط درمانی (علل جنینی و علل مادری)

در بررسی‌های فوق یک نگاه اجمالی و مقایسه‌ای نیز با سال‌های ۱۳۸۱، ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ انجام شد. در سال ۱۳۸۱ و ۸۲ با توجه به محدود بودن مجوز آمار مراجعین بسیار کم بود ولی در سال ۱۳۸۳ به دلیل بخشنامه صادره از سوی سازمان پزشکی قانونی کشور که به تأیید ریاست قوه قضائیه رسید، سیر صعودی بسیار قابل ملاحظه‌ای در مراجعین مشاهده شد. در بررسی درخواست‌ها متوجه مراجعه زنان باردار با هر مشکل جسمی و یا روانی ساده شدیم، پس از دادن آگاهی درست از موارد سقط جنین درمانی به ارباب رجوع، این درخواست‌ها به ظاهر در سال ۱۳۸۴ کاهش یافت ولی نسبت به سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ رشد بالای ۵۰ درصدی را از خود نشان می‌داد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با ارسال این مجوز، روند رو به افزایش در مراجعین و نیز مجوزهای صادره مشاهده شد. با توجه به شرح فوق پیشنهادات مناسب به شرح زیر مطرح می‌گردد.

۱. افزایش میزان آگاهی کادر درمانی مربوطه در مورد مجازات‌های سقط جنینی از طریق مراجع ذیربط
۲. افزایش میزان آگاهی شهروندان در مورد سقط درمانی و محدودیت زمان صدور مجوز از طریق رسانه‌های جمعی

موارد صدور مجوز سقط درمانی بودند که با توجه به میانگین سن مادران و پرخطر بودن این گروه بایستی تدابیری جهت پیشگیری قطعی از بارداری ارائه شود. با توجه به اینکه ۶۸٪ علل سقط درمانی نقص ژنتیکی است. تشخیص زودرس آنها جهت صدور به موقع مجوز سقط درمانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به متوسط سن جنین (حدود ۱۷ هفته) که زمان نزدیکی به ولوج روح می‌باشد با دادن آگاهی لازم به متخصصین و کادر بهداشت و درمان می‌توان در روند ارجاع تسریع نمود تا از گذشت زمان و ولوج روح (۴ ماهگی) پیشگیری شود. از طرفی با توجه به درصد قابل توجه بیماری قلبی عروقی در مادران (۱۷٪) لازم است متخصصین قلب و عروق توصیه‌های لازم و پیگیری‌های دقیق‌تری جهت پیشگیری از حاملگی به این گروه ارائه نمایند.



نمودار ۱: مقایسه آماری تعداد موارد درخواست سقط جنین درمانی در بین سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۴

از میان مراجعین، بسیاری با سن حاملگی بالای ۴ ماه مراجعه نموده بودند که به دلیل ولوج روح امکان صدور مجوز برای آنها وجود نداشت. لذا بهتر است با افزایش میزان آگاهی متخصصین حرف پزشکی علی‌الخصوص زنان زایمان از موارد مجاز سقط جنین درمانی و سن مجاز حاملگی (چهارماهگی) این مشکل را حل کرد. همچنین با توجه به هماهنگی به عمل آمده با مرکز بیماری‌های خاص در خصوص بیماری تالاسمی ماژور در جنین، موارد فوق

بیماری در مادر و یا نقص ژنتیک در جنین آنها مطرح است.

۶. پیگیری پزشکی قانونی در خصوص تعیین نوع نقص های ژنتیک در جنین که باعث حرج مادر می گردد.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسؤول معاینات بالینی مردان اداره کل پزشکی قانونی استان کرمان تشکر و سپاسگزاری می گردد.

۳. پی گیری از طریق مراجع قضایی مربوطه در مورد اندیکاسیون های سقط درمانی به علت نقص های ژنتیکی مانند آناسفالی که معمولاً پس از ۴ ماهگی تشخیص داده می شود.

۴. تکمیل امکانات تشخیصی برای تشخیص زودرس نقص های ژنتیکی در جنین قبل از ۴ ماهگی

۵. هماهنگی کادر بهداشت و درمان با متخصصین زنان و زایمان جهت ارجاع به موقع زنان بارداری که احتمال

Summary

The Study of Abortion Licences Being Issued by Legal Medicine office of Kerman in 2005 and a Short Comparison with Last Years Issued Licences

Ghadipasha M., M.D.¹, Aminian Z., M.D.²

1. Assistant Professor of Legal Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. General Practitioner, Kerman Legal Medicine Office Kerman, Iran.

Introduction: Our great leader *fatwa* allowing abortion in the case of fetal disorders created fundamental change in therapeutic abortion. The aim of this study was to study therapeutic abortion licences being issued by Kerman legal medicine office in 2005 and comparing them with last years issued licences in order to increase the medical team information about the indications of therapeutic abortion and its appropriate time.

Method: This is a non interventional and periodical study and the sample group was pregnant women referring to legal medicine office in 2005 in order to get the abortion licence. All relevant data were recorded in a questionnaire and analyzed by SPSS software.

Results: Therapeutic abortion licence has been given to 24 out of 47 who has been referred during one year. From 24 issued licences, 68% has been issued due to fetus diseases or abnormalities and 32% has been issued because of mother's illnesses. The most important fetus problem was major β - thalasemia and the main problem in mothers was cardiovascular diseases. Mean age of mothers at the time of abortion was 29 years and that of fetus was 17 weeks.

Conclusion: Increase in the rate of therapeutic abortions can decrease the rate of illegal abortions and this in turn increases the pregnant women's health. Therefore, women health can be improved by increasing medical team information about the circumstances under which therapeutic abortion is permissible and its rules as well as criminal abortion punishments. Moreover, it can reduce the gynecologists' problems in this regard.

Key words: Abortion, Therapeutic abortion, Criminal abortion, Legal medicine

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2):147-152

منابع

۱. توفیقی، حسن. تئوری پزشکی قانونی، چاپ چهارم، تهران، سازمان پزشکی قانونی کشور، ۱۳۷۶، ص ۶۳-۱۵۹.
۲. حجی اشرفی، غلامرضا: قانون مجازات اسلامی. تهران، کتابخانه گنج دانش باب دیات، ۱۳۸۲، ص ۶-۹۵.
۳. خمینی، روح...: تحریرالوسیله. جلد ۲، باب لواحق دیات، ص ۷۸-۵۶۸.
۴. صدر، شهاب‌الدین: اندیکاسیون‌های سقط جنین در بیماری‌هایی که خطر مرگ مادر و ناهنجاری‌ها و بیماری‌های جنینی که به مرده‌زایی و یا مرگ نوزاد بلافاصله بعد از تولد منجر می‌گردد. بخشنامه شماره ۱۰/۰۳۹۳۸ مورخه ۸۲/۷/۲۷، سازمان پزشکی قانونی کل کشور.
۵. علامه حلی: تبصره المتعلمین، فصل ۱۱، ص ۲۰۵.
۶. قرآن کریم. ترجمه: الهی قمشه‌ای، مهدی. بنیاد نشر قرآن، ۱۳۸۰، ص ۸-۵۰۷.
۷. گودرزی، فرامرز و کیانی، مهرناز: تئوری پزشکی قانونی. چاپ اول، تهران، سازمان مطالعه و تدوین کتب علوم انسانی دانشگاه‌ها (سمت)، ۱۳۸۴، ص ۸-۲۷۳.
۸. ناصرزاده، محمد. مجموعه کامل قوانین و مقررات جزائی. تهران، انتشارات خورشید، ۱۳۷۷، ص ۵۷۸.
9. Cunningham F.G, Leveno KJ, Bloom S.L., Hauth J.C, Gilstrap L.C, Westrom K.D: William's Obstetrics 22nd ed., 2005; P232.
10. Knight B: Simpson's Forensic Medicine. 11th ed., Arnold, 1997; P427.
11. Rosenfield A. Abortion and Woman's reproductive health. *Int J Obstect Gynecol* 1997; 46: 173-9.

