

بررسی واکنش ایمنولوژیک متقاطع بین کیست هیداتیک و سرطان

شیمیا دانش پور^۱، مهران برادران^۲، مرتضی یوسفی^۳، ناهید مرتضوی دهکردی^۱، مهدی محمود زاده^۴،

عباسعلی اسکندریان^۲، سید حسین حجازی^۲، حسین یوسفی دارانی^۲

^۱دانشجو، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۲گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛

^۳دانشجوی رشته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۴گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۷

چکیده:

زمینه و هدف: کیست هیداتیک مرحله لاروی سستود اکینوکوکوس گرانولوزوس می باشد. در مطالعات گذشته خاصیت ضد سرطانی بعضی از انگل ها نشان داده شده است. همچنین وجود آنتی ژن های مشترک بین بعضی انگل ها از جمله کیست هیداتیک و سرطان گزارش شده است. این مطالعه با هدف بررسی واکنش متقاطع بین آنتی ژن های سلول های سرطانی و کیست هیداتیک انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی، آنتی ژن های مختلف کیست هیداتیک تهیه و بر علیه آن ها آنتی بادی در خرگوش ایجاد شد. در روش دات بلات واکنش های متقاطع آنتی ژن های فوق با سرم بیماران سرطانی (جمع آوری شده از بیمارستان امام حسین اصفهان) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین واکنش های متقاطع آنتی ژن دفعی ترشعی سلول های سرطانی و آنتی بادی های تولید شده در خرگوش با این روش مورد بررسی قرار گرفت. برای حذف کربوهیدرات آنتی ژن ها، بافر سدیم پرودایت مورد استفاده قرار گرفت. **یافته ها:** آنتی بادی ضد لایه کوتیکولی و ژرمینال با مواد دفعی ترشعی سلول های سرطانی واکنش نشان داد. همچنین بین سرم بیماران مبتلا به کیست هیداتیک و آنتی ژن های کیست هیداتیک واکنش مشاهده گردید. مقداری از این واکنش مربوط به باندهای کربوهیدرات موجود در آنتی ژن ها بود.

نتیجه گیری: مشاهده واکنش متقاطع ایمنولوژیک بین کیست هیداتیک و سلول های سرطانی در این تحقیق نشان دهنده وجود آنتی ژن های مشترک در سرطان و کیست هیداتیک می باشد و لذا تحقیقات بیشتری در این زمینه توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: کیست هیداتیک، سرطان، واکنش ایمنولوژیک متقاطع.

مقدمه:

سرطانی تریپانوزوما کروز (۸-۳)، توکسوپلاسما گوندی (۱۱-۸) و تعداد دیگری از انگل ها نشان داده شده است. پروتواسکولکس های کیست هیداتیک در محیط کشت سلولی باعث کاهش رشد سلول های سرطانی می گردند (۱۲). از طرف دیگر وجود آنتی ژن های مشترک بین سرطان ها و بعضی انگل ها نشان داده شده است (۱۳-۱۵).

بسیاری از مارکرهای سلول های بدخیم مربوط به کربوهیدرات ها و پپتیدهای موسین هستند. این ساختارها باعث رفتار بیولوژیکی و فنوتیپ سلول سرطانی

کیست هیداتیک که مرحله لاروی کرم سستود اکی نوکوکوس گرانولوزوس است، یک آلودگی انگلی مشترک بین انسان و دام می باشد. این کیست در احشای مختلف انسان مستقر شده و بعضاً باعث ایجاد بیماری می گردد. کیست هیداتیک مستقر در بدن میزبان تحت تأثیر سیستم ایمنی قرار گرفته و گاه هم این سیستم را تحت تأثیر قرار می دهد (۱).

در مطالعات گذشته امکان استفاده از آنتی ژن های انگل ها به عنوان راهی برای درمان سرطان ها مطرح شده است (۲). همچنین خاصیت ضد

ژن دفعی ترشعی و آنتی ژن خام پروتواسکولکس مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه آنتی ژن خام، پروتواسکولکس ها با دستگاه سونیکاتور آنقدر سونیکه شدند تا ساختمان تمام پروتواسکولکس ها متلاشی گردد. برای تهیه آنتی ژن دفعی ترشعی انگل، پروتواسکولکس ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده و پس از سانتریفوژ مایع رویی به عنوان آنتی ژن دفعی ترشعی پروتواسکولکس نگهداری شد. برای تهیه آنتی ژن لایه کوتیکولی و زایا، این لایه ها ابتدا همورنه شدند و سپس سونیکه گردیدند. در نهایت مخلوط سونیکه شده سانتریفوژ گردید و مایع رویی به عنوان آنتی ژن نگهداری شد. آنتی ژن لایه فیبری هم مانند آنتی ژن لایه کوتیکولی تهیه شد. سلول های سرطانی رده (Baby Hamster Kidney= BHK) در محیط کشت سلولی برای مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و پس از سانتریفوژ مایع رویی به عنوان آنتی ژن دفعی ترشعی سلول های سرطانی نگهداری شد. برای تهیه آنتی بادی ضد آنتی ژن های فوق، آنتی ژن ها در ترکیب با ادجونت فروندز به خرگوش تزریق شدند. برای تست دات بلات ده میکرولیتر از هر کدام آنتی ژن ها روی کاغذ نیتروسولوز قرار گرفت و پس از نیم ساعت کاغذ نیتروسولوز در محلول یک در صد آلبومین به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس کاغذ مذکور با آنتی سرم برای مدت سه ساعت مجاورت گردید و بعد از سه شستشو کاغذ نیتروسولوز با آنتی بادی ثانویه (کونژوگه) مجاورت گردید. نهایتاً پس از سه بار شستشو، سوبستر اضافه گردید. برای حذف باندهای کربوهیدرات، آنتی ژن ها با بافر سدیم پریدایت تیمار گردیدند.

یافته ها:

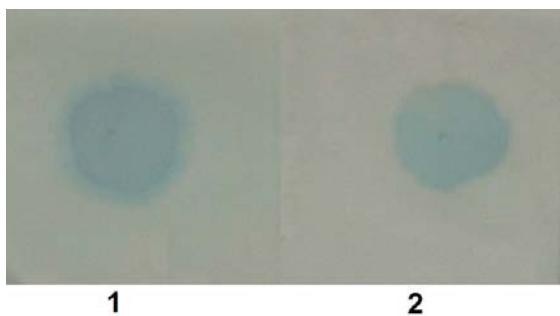
در یک آزمایش مواد دفعی ترشعی سلول های سرطان (BHK) در دات بلات با آنتی سرم خرگوش که ضد آنتی ژن های کیست هیداتیک تهیه گردیده بود

مانند تغییر در شکل و سایز سلول می شوند (۱۶). این ۰-گلیکان های غیر نرمال به ویژه یک ۰-گلیکان ناقص در موسین منجر به بروز ساختار کربوهیدراتی کوتاه مانند آنتی ژن alpha-N-acetylgalactosamine-O-serine/threonine (Tn) Thomsen-Friedenreich (TF) آنتی ژن می شود که نقش مهمی در چسبندگی سلول سرطانی به بافت اطراف خود و متاستاز سلول و همچنین جلوگیری از مرگ سلول دارد. همچنین این موسین ها در ممانعت از لیز سلول ها به وسیله سلول های کشنده طبیعی (Natural killer cell= NK) نقش دارند و با لنفوسیت های سیتوتوکسیک وارد عمل می شوند (۱۷). جالب این که موسین نوع ۰-گلیکان وابسته به سرطان به وسیله بعضی انگل ها عرضه می شود و بعضی گلیکان های مشتق از پارازیت به عنوان واکسن در نظر گرفته می شوند (۱۸). برای مثال انگل هایی مانند شیسستوزوما مانسونی (۱۹) و اکی نوکوکوس گرانولوزوس (۲۰) دارای آنتی ژن هایی به نام Tn آنتی ژن هستند. این آنتی ژن ها در سطح سلول های سرطانی هم بیان می شوند (۲۱). Tn آنتی ژن به طور عمده در معده و ترشحات فاسیولاهپاتیکا عرضه می شوند. همچنین این آنتی ژن روی بیضه ها و sialyle Tn در سطح سلول های اپیتلیال و غشای بازال تگومنت فاسیولاهپاتیکا یافت می شود (۲۲). با توجه به تأثیر ضد سرطانی بعضی انگل ها و همچنین با توجه به وجود آنتی ژن های مشترک بین انگل ها و سلول های سرطانی، در این تحقیق واکنش مقاطع ایمنولوژیک بین کیست هیداتیک و سرطان مورد بررسی قرار گرفته است.

روشی بررسی:

در این مطالعه توصیفی کیست هیداتیک از کشتارگاه خمینی شهر اصفهان جمع آوری گردید. مایع کیست هیداتیک با سرنگ تخلیه گردید و با دور ۲۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به عنوان مایع کیست هیداتیک جمع آوری گردید. رسوب که حاوی تعداد زیادی پروتواسکولکس بود برای تهیه آنتی

سرم خرگوش ایمونیزه شده بر ضد لایه لامینیت در دو حالت مجاورت آنتی ژن سلول سرطانی با بافر سدیم پریدایت و بدون مجاورت آنتی ژن با بافر سدیم پریدایت در روش دات بلا تینگ بررسی گردید. در این آزمایش واکنش قوی تری در دات بلا تینگ آنتی ژن هایی که با بافر سدیم پریدایت مجاورت نداشتند نسبت به گروهی که مجاورت داشتند مشاهده شد (تصویر شماره ۳).



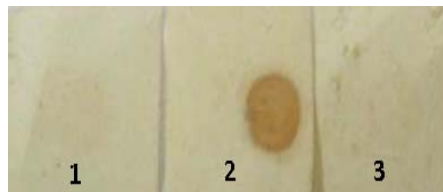
تصویر شماره ۳: دات بلا ت آنتی ژن دفعی ترشچی سلول سرطانی رده BHK با سرم خرگوش ایمونیزه شده بر ضد لایه لامینیت

۱: بدون مجاورت آنتی ژن با بافر سدیم پریدایت؛ ۲: در مجاورت آنتی ژن سلول سرطانی با بافر سدیم پریدایت.

بحث:

در این تحقیق نشان داده شده است که آنتی ژن های کیست هیداتیک و سلول های سرطانی از نظر ایمنولوژیک واکنش متقاطع دادند. احتمال دارد که واکنش متقاطع ایمنولوژیک مشاهده شده در این تحقیق مربوط به آنتی ژن های Tn باشد که بین کیست هیداتیک و بعضی انگل های دیگر و سرطان ها مشترک هستند. Tn آنتی ژن ها نقش مهمی در متاستاز سرطان ها دارند (۲۱). همچنین این آنتی ژن ها نقش مهمی در ارتباط بین بعضی از انگل های کرمی و میزبان شان دارند (۲۳). بیان Tn آنتی ژن در انگل هایی مانند شیتوزوما مانسونی (۱۹) نشان داده شده است. این مولکول ها در انگل هایی دیگری هم بیان می شوند (۱۳).

مجاورت گردید. آنتی سرم ضد لایه کوتیکولی با مواد دفعی ترشچی سلول های سرطان واکنش نشان داد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: دات بلا ت مواد دفعی ترشچی

سلول های سرطانی BHK با آنتی بادی های ضد آنتی ژن.

۱: ضد آنتی ژن خام پروتواسکولکس؛ ۲: ضد لایه زایا و کوتیکولی کیست هیداتیک؛ ۳: ضد آنتی ژن دفعی ترشچی کیست هیداتیک.

در آزمایش دیگر دات بلا ت آنتی ژن ها مایع کیست، پروتواسکولکس، لایه کوتیکولی و لایه فیبری با سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان مجاورت گردیدند. در این آزمایش سرم بیماران با آنتی ژن های لایه کوتیکولی و لایه فیبری واکنش نشان داد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: آنتی ژن های مختلف کیست

هیداتیک در مجاورت سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان

از سمت چپ به راست: مایع کیست هیداتیک؛ آنتی ژن خام پروتواسکولکس؛ لایه کوتیکولی و زایا و لایه فیبری.

در آزمایش دیگر واکنش متقاطع ایمنولوژیک بین آنتی ژن دفعی ترشچی سلول سرطانی رده BHK با

این تحقیقات با نتایج تحقیق ما هماهنگ است و تأکید بر وجود آنتی ژن های مشترک بین انگل ها و سرطان دارد واکنش متقاطع آنتی ژن های کیست هیداتیک و سرم بیماران مبتلا به کیست هیداتیک در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۲۴،۲۵). در یک مطالعه از ۲۷۰ بیمار مبتلا به سرطان فقط ۶/۳ درصد آن ها نسبت به آنتی ژن مایع کیست هیداتیک واکنش نشان دادند که از این تعداد هیچکدام در آزمایش وسترن بلات واکنش نشان ندادند (۲۵).

آنتی ژن Tn یک گلیکوپروتئین می باشد که در طول مراحل اولیه انواع مختلفی از بدخیمی ها از جمله سرطان سینه پانکراس ریه دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی بیان می شود. این آنتی ژن همچنین در ملانوما، انواع لوسمی، لنفوم سارکوما و تومورهای سیستم عصبی مرکزی شناسایی شده است. به دلیل اهمیت این موضوع واکنش حاوی این آنتی ژن برای پیشگیری از سرطان جهت درمان سرطان سینه پیشنهاد شده است. موسین نوع ۰-گلیکان نقش مهمی در متاستاز سرطان ها دارند این ملکول ها همچنین نقش مهمی در واکنش و کرم ها با میزبان شان دارند. ساختار موسین نوع ۰-گلیکان در سرطان ها توسط کرم بالغ شistosoma مانسونی هم عرضه می شوند. این ملکول ها همچنین در بعضی از کرم های دیگر مانند اکینووکوس گرانولوزوس، تنیا کراسی سپس، مزوسستوئیدس و تنیا هیداتیژنا هم عرضه می شوند. بر طبق این بررسی موسین نوع ۰-گلیکان هم در سرطان و هم در انگل ها عرضه می شوند (۲۳).

گلیکوپروتئین ها در بیولوژی انگل ها و همین طور در الفای احتمالی پاسخ ایمنی میزبان نقش دارند. تحقیقات در زمینه ایمنوبیولوژی گلیکان ها در انگل ها ممکن است به شناسایی داروهای جدید و ساخت واکنش های بر پایه کربوهیدرات ها کمک کند. به همین دلیل آنتی ژن انگل ها به عنوان مولکول هایی برای درمان سرطان ها مطرح شده اند (۲). با توجه به اینکه آنتی ژن های مشترک بین انگل ها و سرطان ها عمدتاً گلیکوپروتئین هستند، به نظر می رسد که بیشتر واکنش متقاطع بین آن ها مربوط به کربوهیدرات ها باشد که این مسئله در تحقیقات قبل مورد توجه قرارنگرفته است. به هر حال واکنش بین آنتی سرم های ضد کیست هیداتیک و مواد دفعی ترشعی سلول های سرطانی در این تحقیق یک یافته کاملاً جدید است. در این تحقیق واکنش متقاطع بین آنتی ژن های کیست هیداتیک و مواد دفعی ترشعی سرطانی ها نشان داده شده است و لذا تحقیقات بیشتری برای شناسایی ماهیت آنتی ژن های درگیر توصیه شود.

نتیجه گیری:

واکنش متقاطع بین انگل و سرطان ها نشان دهنده وجود آنتی ژن مشترک بین این دو می باشد و لذا احتمالاً می توان از آنتی ژن های انگل ها جهت تحریک سیستم ایمنی در جهت مهار رشد سرطان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

هزینه انجام این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردیده است.

منابع:

1. Zhang W, Ross AG, McManus DP. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. J Immunol. 2008; 181(10): 6679-85.
2. Darani HY, Yousefi M. Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. Future Oncol. 2012; 8(12): 1529-35.

3. Batmonkh Z, Kallnikova VD, Pakhorukova LV, Kravtsov EG, Karpenko LP, Dalin MV. In vivo anticancer activity of lysates from trypanosoma cruzi of different genetic groups. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 142(4): 470-3.
4. Kallnikova VD, Batmonkh T, Kosobokova EN, Pakhorukova LV, Ogloblina TA, Kravtsov EG, et al. Antibodies against Trypanosoma cruzi in intact mice and their oncoprotective effect. *Med Parazitol (Mosk)*. 2008; (1): 11-5.
5. Kallnikova V, Matekin P, Ogloblina T, Leikina M, Kononenko A, Sokolova N, et al. Anticancer Properties of Flagellate Protozoan Trypanosoma cruzi Chagas, *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 1909; (3): 299-311.
6. Kallnikova VD, Borisova EN, Pakhorukova LV, Ogloblina TA, Batmonkh T, Kravtsov EG, et al. Immunization against Trypanosoma cruzi and tumor growth in mice. *Med Parazitol (Mosk)*. 2006 ; (4): 9-12.
7. Zenina AV, Kravtsov EG, Tsetsegsaikhan B, Yashina NV, Dalin MV, Karpenko LP, et al. The study of immunological component in antitumor effect of Trypanosoma cruzi. *Bull Exp Biol Med*. 2008 Mar; 145(3): 352-4.
8. Choo JD, Lee JS, Kang JS, Lee HS, Yeom JY, Lee YH. Inhibitory Effects of Toxoplasma Antigen on Proliferation and Invasion of Human Glioma Cells. *J Korean Neurosurg Soc*. 2005 Feb; 37(2): 129-136.
9. Darani HY, Shirzad H, Mansoori F, Zabardast N, Mahmoodzadeh M. Effects of Toxoplasma gondii and Toxocara canis antigens on WEHI-164 fibrosarcoma growth in a mouse model. *Korean J Parasitol*. 2009; 47(2): 175-7.
10. Kim JO, Jung SS, Kim SY, Kim TY, Shin DW, Lee JH, et al. Inhibition of Lewis lung carcinoma growth by Toxoplasma gondii through induction of Th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. *J Korean Med Sci*. 2007 Sep; 22: S38-46.
11. Suzuki Y, Muto M, Kobayashi A. Antitumor effect of formalin-fixed Toxoplasma gondii organisms on EL4 lymphoma in Toxoplasma-infected mice. *J Biol Response Mod*. 1986 Aug; 5(4): 288-93.
12. Yousofi Darani H, Soozangar N, Khorami S, Taji F, Yousofi M, Shirzad H. Hydatid Cyst Protoscolices Induce Cell Death in WEHI-164 Fibrosarcoma Cells and Inhibit the Proliferation of Baby Hamster Kidney Fibroblasts In Vitro. *J Parasitol Res*. 2012; 2012: 304183.
13. Alvarez Errico D, Medeiros A, Miguez M, Casaravilla C, Malgor R, Carmona C, et al. O-glycosylation in Echinococcus granulosus: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Exp Parasitol*. 2001 Jun; 98(2): 100-9.
14. Thors C, Jansson B, Helin H, Linder E. Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in Schistosoma mansoni: localization and immunogenicity in experimental mouse infection. *Parasitology*. 2006 Jan; 132(1): 73-81.
15. Ubillos L, Medeiros A, Cancela M, Casaravilla C, Saldana J, Dominguez L, et al. Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen in helminth parasites. *Exp Parasitol*. 2007 Jun; 116(2): 129-36.
16. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan; 4(1): 45-60.
17. Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Bio*. 1995 Apr; 129(1): 255-65.
18. Nyame AK, Kwar ZS, Cummings RD. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch Biochem Biophys*. 2004; 426(2): 182-200.
19. Nyame K, Cummings RD, Damian RT. Schistosoma mansoni synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*. 1987 Jun 15; 262(17): 7990-5.

20. Casaravilla C, Freire T, Malgor R, Medeiros A, Osinaga E, Carmona C. Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Parasitol.* 2003 Aug; 89(4): 709-14.
21. Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41(2): 189-231.
22. Freire T, Casaravilla C, Carmona C, Osinaga E. Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Int J Parasitol.* 2003 Jan; 33(1): 47-56.
23. Thomas PG, Harn DA, Jr. Immune biasing by helminth glycans. *Cell Microbiol.* 2004 Jan; 6(1): 13-22.
24. Dar FK, Buhidma MA, Kidwai SA. Hydatid false positive serological test results in malignancy. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984 Apr 21; 288(6425): 1197.
25. Pfister M, Cerny T, Cerny A. Immunodiagnosis of echinococcosis in cancer patients. *Clin Microbiol Infect.* 1999; 5: 693-7.

Immunological cross reaction between cancer cells and hydatid cyst

Daneshpour SH¹, Baradaran M², Yousefi M³, Mortazavi-Dehkordi N¹,
Mahmoudzadeh M⁴, Eskandarian A², Hejazi SH², Yousofi Darani H^{2*}

¹Student, Parasitology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran;

²Parasitology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran;

³Student of General Physician, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran;

⁴Internal Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 6/May/2013

Accepted: 25/Sep/2013

Background and aims: Hydatid cyst is the larval stage of the tape worm *Echinococcus granulosus*. Anticancer effects of some parasites have been shown. Moreover, existence of common antigens between some parasites especially hydatid cyst and cancers have been reported. So, immunological cross reaction between hydatid cyst and cancer cell antigens has been investigated in this study.

Methods: In this laboratory descriptive study, different hydatid cyst antigens were prepared and antibody raised against them in rabbits. In dot immunoblotting, those antigens were probed with sera of patients with cancers (collected from Imam Hossein Hospital in Isfahan). Also, cross reaction among excretory secretory products of cancer cells and antisera raised against different hydatid cyst antigen was investigated. In order to remove carbohydrate bands of antigens, sodium periodate buffer was used.

Results: Antisera raised against laminated & germinal layers of hydatid cyst reacted with excretory secretory products of cancer cells. Also, antigens of hydatid cysts reacted with cancer patients sera. Carbohydrate bands of antigens were involved in some immunological cross reactions.

Conclusion: Results of this work emphasis existence of common antigens between hydatid cyst and cancers. Therefore, more study about these common antigens is recommended.

Keywords: Hydatid cyst, Cancer, Immunological cross reaction.

Cite this article as: Daneshpour Sh, Bahadoran M, Yousefi M, Mortazavi Dehkordi N, Mahmoudzadeh M, Eskandarian A, et al. Immunological cross reaction between cancer cells and hydatid cyst. J Sharekord Univ Med Sci. 2014 Apr, May; 16(1): 99-105.

*Corresponding author:

Parasitology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.
Tel: 00983117922489, E-mail: Yousofi@med.mui.ac.ir