

## بررسی و مقایسه میزان ایمنی زایی پروتئین های نو ترکیب زیر واحد اتصالی توکسین های کزاز و بوتولینوم (تایپ A)

احسان رضایی<sup>۱،۳</sup>، علی میری<sup>۱،۵</sup>، جعفر سلیمیان<sup>۲\*</sup>، غلام رضا اولاد<sup>۲</sup>، مجتبی سعادت<sup>۱،۳</sup>، مرضیه ابراهیمی<sup>۴</sup>، حسن بوستانی<sup>۶</sup>

- (۱) گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین(ع) تهران  
 (۲) مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران  
 (۳) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران  
 (۴) پژوهشکده سلول های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان تهران  
 (۵) مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران  
 (۶) گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

### چکیده

**مقدمه:** تنها واکسن موجود علیه تتانوسپاسمین (عامل اصلی بیماری کشنده کزاز) توکسوئید آن است که مصونیت ۱۰ ساله ایجاد می کند. در حالی که توکسوئید بوتولینوم (عامل بیماری کشنده بوتولیسم) تنها مصونیت ۲ ساله ایجاد مصونیت می نماید. این دو توکسین با ۳۶ درصد همولوژی در یک خانواده قرار دارند اما خاطره ایمنی و میزان پاسخ ایمنی هومورال و احتمالاً میزان تولید آنتی بادی علیه هر کدام متفاوت می باشد. هدف از مطالعه حاضر این است که قطعه C از هر دو توکسین کزاز (THC) و بوتولینوم تایپ A (BONT/A-Hc) از نظر میزان ایمنی زایی و تیتراژ آنتی بادی مورد مقایسه قرار گیرند.

**مواد و روش ها:** بیان پروتئین های نو ترکیب THC و BONT/A-Hc با استفاده از میزبان E. coli B121 DE3 تراریخته با وکتورهای pET28a حاوی این دو ژن در شرایط بهینه انجام گردید. هر دو پروتئین مذکور از فاز محلول عصاره سلولی استخراج و تخلیص شده و بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. سپس تیتراژ آنتی - بادی موجود در سرم حیوانات ایمن با هر کدام از این دو پروتئین، به وسیله تست الایزا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. **یافته های پژوهش:** نتایج ارزیابی ژل SDS-PAGE نشان از بیان و تخلیص مناسب هر دو پروتئین نو ترکیب، THC و BONT/A-Hc در فاز محلول عصاره سلولی داشت. نتایج الایزای سرم حیوانات ایمن با این دو پروتئین نیز نشان داد که تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین نو ترکیب THC بسیار بالاتر از BONT/A-Hc می باشد. **بحث و نتیجه گیری:** به نظر می رسد اختلاف تیتراژ آنتی بادی ممکن است با طول عمر سلول های خاطره ای هر کدام ارتباط داشته باشد که نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

**واژه های کلیدی:** تیتراژ آنتی بادی، ایمنی زایی، سلول های خاطره، توکسین کزاز، توکسین بوتولینوم

\* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

## مقدمه

سنگین توکسین کلستریدیوم بوتولینوم که وظیفه اتصال به سلول های عصبی را به عهده دارد از قابلیت بالایی در تحریک سیستم ایمنی برخوردار می باشد، (۶،۷). توکسین کزاز و توکسین بوتولینوم به این دلیل که در یک خانواده قرار می گیرند، همولوژی نسبتاً زیادی با یکدیگر دارند. همولوژی این دو حدود ۳۶ درصد محاسبه شده است، (۸). در حالی که همولوژی بین دومین HC این توکسین ها، ۳۳ درصد می باشد. در مطالعات انجام شده نشان داده شده است که علی رغم این میزان از همولوژی، در نتیجه ایمنی زایی افراد با این دو پروتئین، توکسوئید تتانی خاطره ایمونولوژی ۱۰ ساله ای را به وجود می آورد. به عبارت دیگر فرد دریافت کننده واکسن توکسوئیدی تا یک دهه از بیماری کزاز محافظت می گردد. در حالی که توکسوئید بوتولینوم خاطره ای دو ساله را ایجاد می کند و در ردیف آنتی ژن هایی قرار می گیرد که مصونیتی نه چندان طولانی را در سیستم ایمنی فرد القاء می کند. هدف از این مطالعه ارزیابی تیتراژ آنتی بادی ترشح شده در برابر هر یک از این آنتی ژن ها و سپس مقایسه آن ها با یکدیگر می باشد.

## مواد و روش ها

دو میزبان E. coli B121 DE3 تراریخت شده با وکتور pET28a که یکی حاوی ژن نو ترکیب بخشی از زنجیره سنگین توکسین تتانی (THC) بوده و دیگری حاوی ژن نو ترکیب قسمت Hc توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تایپ A (BONT/A-Hc) می باشد، (۴). و در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری می شد جهت بیان پروتئین نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت. بیان اولیه در شرایط پایه در مورد هر دو ژن صورت گرفت. بررسی محصولات بیان اولیه به وسیله ژل SDS-PAGE انجام گردید. بهینه سازی بیان در مورد هر دو نوع پروتئین نو ترکیب و در سه متغیر (دما، زمان و غلظت ماده القاء کننده) صورت پذیرفت. تولید پروتئین نو ترکیب THC در مقیاس بالای آزمایشگاهی (۵۰۰ میلی لیتر) و با شرایط بهینه شده (غلظت ۲۰ μg/ml کانامایسین، افزودن IPTG با غلظت ۱mM در OD=۰/۶، دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و زمان ۶ ساعت و سرعت ۱۵۰rpm انجام شد.

خانواده نورو توکسین کلستریدیوم از نورو توکسین کزاز و هفت نورو توکسین متمایز بوتولینوم تشکیل شده است که سبب بیماری کزاز و بوتولیسم می گردند. در میان کلستریدیوم های نوروپارالیتیک، کلستریدیوم تتانی و کلستریدیوم بوتولینوم، قوی ترین توکسین ها را تولید می نمایند. این توکسین ها به خاطر اختصاصیت فوق العاده به نورون ها و نیز داشتن خاصیت کاتالیکی در غلظت های بسیار پائین سوبستراهای نورونی (متغیر بین ۱۰-۱۲ تا ۱۰-۱۳) می توانند تا این اندازه با قدرت عمل نمایند، (۱). کلستریدیوم تتانی با تولید تانوتوکسین بیماری کزاز را به وجود می آورد. بیماری که به طور بالقوه کشنده می باشد و بر سیستم عصبی تاثیر می گذارد. این بیماری با درد و انقباضات غیر ارادی ماهیچه ای مشخص می گردد، (۲). توکسین کزاز متشکل از یک زنجیره سنگین و یک زنجیره سبک می باشد که به وسیله باندی دی سولفیدی به هم اتصال یافته اند. زنجیره سبک، قسمت کاتالیکی توکسین را به وجود می آورد، در حالی که ناحیه انتهای C زنجیره سنگین اتصال به گانگلیوزیدهای نورون ها را انجام می دهد، (۳).

نورو توکسین دیگری از این خانواده از باکتری کلستریدیوم بوتولینوم ترشح می گردد که می تواند از طریق سطوح مخاطی وارد گردش خون شده و به وسیله جلوگیری از آزاد شدن استیل کولین در پایانه های عصبی، فلج عضلانی پیش رونده را موجب شده که در موارد حاد معمولاً منجر به مرگ خواهد شد، (۴). نورو توکسین بوتولینوم تایپ A (BoNT/A)، قوی ترین توکسین در میان تمام توکسین های گیاهی، جانوری، باکتریایی و ترکیب های شیمیایی است. BoNT/A به صورت یک تک زنجیره پروتئینی با فعالیت پائین تولید می شود و در صورت برش پروتئولیتیکی، به دو زنجیره سبک (۵۰ کیلودالتون) و زنجیره سنگین (۱۰۰ کیلودالتون) فعال تبدیل می شود. نیمه انتهای کربوکسیلی زنجیره سنگین که قطعه C نامیده می شود، پذیرنده سطحی سلول های نورونی را شناسایی کرده و به آن اتصال می یابد، (۵). این پروتئین ۵۰ کیلودالتونی واقع در انتهای کربوکسیلی زنجیره

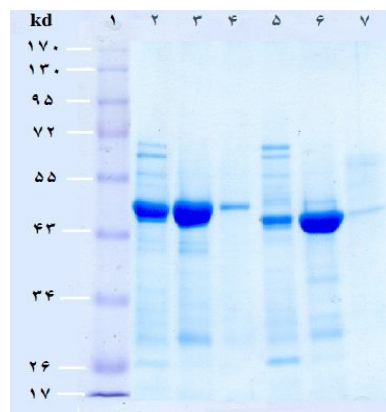
تزریق اول و دوم ۲۰ روز و فاصله تزریقات بعدی نسبت به هم ۱۴ روز در نظر گرفته شد. سه هفته پس از آخرین تزریق خون گیری از گوشه چشم موش ها صورت گرفت. نمونه های خون یک روز در یخچال (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شده و پس از سانتریفیوژ (دور rpm ۵۰۰۰، دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه)، سرم آن ها جداسازی گردید. از الیازای غیرمستقیم برای سنجش (تیتراسیون) آنتی بادی استفاده شد. میزان آنتی ژن چسبانده شده در هر چاهک  $5 \mu\text{g}$  بود. رقت های ۱:۱۰۰ تا ۱:۱۲۸۰۰ از سرم تهیه و به چاهک ها افزوده شد و از کونژوگه با رقت ۱:۱۵۰۰۰ در این تست استفاده گردید. پس از استفاده از سوبسترای مربوطه میزان OD به وسیله دستگاه الیازا ریدر قرائت گردید و در نهایت نتایج الیازا و تیتراسیون بادی هر کدام مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفت.

#### یافته‌های پژوهش

نتایج ژل SDS-PAGE، بیان مناسب پروتئین نوترکیب THC را در دو فاز محلول و نامحلول نشان می دهد (شکل شماره ۱، ستون های ۲، ۳، ۴). اما بیان قابل توجهی از پروتئین نوترکیب BONT/A-Hc مشاهده نشد. اما پس از بهینه سازی بیان ژن، به خصوص در مورد ژن BONT/A-Hc افزایش چشم - گیر بیان مشاهده گردید (شکل شماره ۱، ستون های ۵، ۶، ۷). تخلیص هر دو پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل به خوبی صورت گرفت و ژل SDS-PAGE از نمونه های خالص شده این مسئله را به وضوح نشان داد. (شکل شماره ۱)

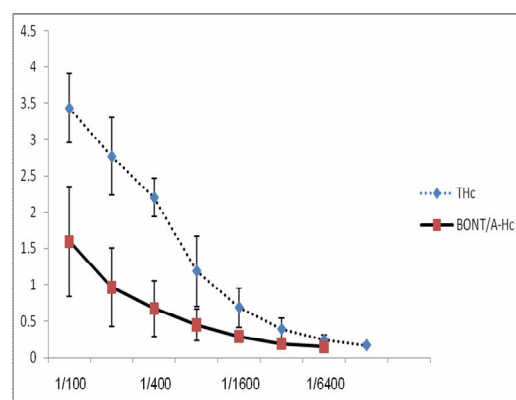
سه هفته پس از اتمام ایمنی زایی با هر دو نمونه THC و BONT/Hc، خون گیری، جداسازی سرم و سپس آزمایش الیازا برای هر دو سرم حاصل انجام شد که نمودار شماره ۱، نتایج به دست آمده را نشان می - دهد. همان طور که مشاهده می شود، سرم از ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ رقیق شده است.

تولید پروتئین نوترکیب BONT/A-Hc نیز در حجم (۴۰۰ میلی لیتر) و در شرایط بهینه شده (غلظت  $1 \text{ mM}$  IPTG با غلظت  $20 \text{ mg/ml}$  در  $OD=0.8$ ، دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و زمان ۲۰ ساعت و سرعت  $150 \text{ rpm}$  انجام گردید. با توجه به وجود هر دو پروتئین نوترکیب بیانی فوق در فاز محلول، تخلیص این پروتئین ها، به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA و با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول انجام گردید. خروجی های ستون به وسیله SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت هر یک از پروتئین های نوترکیب با روش برادفورد اندازه گیری گردید. جهت بررسی های ایمنی زایی، یک گروه ۱۰ تایی از موش برای هر یک از آنتی ژن ها در نظر گرفته شد و علاوه بر آن یک گروه ۵ تایی نیز به عنوان گروه کنترل تعیین گردید. مقدار  $250 \mu\text{l}$  از آنتی ژن محلول THC (حاوی  $1 \text{ mg}$  حجم آن (۱ میلی لیتر) ادجوانت کامل فروند اضافه گردید و برای تزریق اول به صورت زیرجلدی استفاده گردید. به این ترتیب از ۱۰ موشی که جهت ایمنی زایی با LTB در نظر گرفته شده بودند، هر یک،  $25 \mu\text{g}$  از آنتی ژن THC را در اولین تزریق دریافت نمودند. جهت ایمنی زایی گروه دوم موش ها با BONT/A-Hc،  $500 \mu\text{g}$  میکرولیتر آنتی ژن BONT/A-Hc با غلظت  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  با  $500 \mu\text{l}$  بفر PBS مخلوط شده و با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر ادجوانت کامل فروند حجم نهایی ۲ ml رسانده شد و پس از مخلوط نمودن کامل، به هر یک از موش های گروه دوم تست ۲۰۰ میکرولیتر حاوی ۲۵ میکروگرم از آنتی ژن مذکور به صورت زیرجلدی تزریق گردید. در هر مرحله از تزریق میزان آنتی ژن تزریقی کاهش داده شد به طوری که در تزریق دوم  $22 \mu\text{g}$ ، در تزریق سوم  $19 \mu\text{g}$  و در تزریق چهارم  $15 \mu\text{g}$  از هر آنتی ژن به صورت زیرجلدی تزریق گردید. ضمناً در تزریق دوم، سوم و چهارم ادجوانت ناقص فروند مورد استفاده قرار گرفت. فاصله



شکل شماره ۱. ژل SDS-PAGE از پروتئین های نوترکیب تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی ستون ۱. نشانگر پروتئینی

ستون های ۲، ۳، ۴ خروجی پروتئین نوترکیب THc از ستون پس از شستشو به ترتیب با بافرهای D، C، E (حاوی غلظت های متفاوت ایمیدازول) ستون های ۵، ۶، ۷ خروجی پروتئین نوترکیب BONT/A-Hc از ستون پس از شستشو با بافرهای D، C، E (حاوی غلظت های متفاوت ایمیدازول)



نمودار شماره ۱. مقایسه تیترا آنتی بادی حاصل از دو آنتی ژن THc و BONT/Hc

ژن از راه خون وارد بدن می گردد، به طحال داخل شده و سلول های B منطقه مرزی را فعال می نماید. در صورتی که وقتی آنتی ژنی از راه زیرجلدی وارد شود، از طریق فرایند پیچیده ای، با به دام انداختن آنتی ژن و ترافیک سلول B، سلول های B فولیکولی را فعال می کند. بدون در نظر گرفتن منشاء سلول های B فعال شده، نتیجه خیلی مشابه بوده و باعث تحریک سلول های B در یک ناحیه می شوند، (۱۱). ماهیت آنتی ژن نیز از موارد بسیار با اهمیت می باشد. به گونه ای که پلی ساکاریدهای باکتریایی برخلاف پروتئین ها، تنها پلاسماسل هایی با عمر کوتاه را (در نتیجه راه اندازی پاسخ های سلول B مستقل از سلول T) تولید می نمایند و حتی سبب تولید سلول های خاطره نخواهند شد. در ضمن واکنش مراکز زایا (که نقش بسیار اساسی در به وجود آمدن سلول های خاطره دارند) بسته به ماهیت آنتی ژن ممکن است متفاوت باشد، (۱۰). موارد زیاد دیگری نیز وجود دارند که هر کدام می توانند ابتدا

همان طور که در نمودار مشاهده می شود، در همه غلظت های آنتی بادی از ۱ به ۱۰۰ تا ۱ به ۱۲۸۰۰ اختلاف آشکاری میان تیترا آنتی بادی حاصل از دو آنتی ژن THc و BONT/Hc وجود دارد.

### بحث و نتیجه گیری

موارد متعددی وجود دارند که می توانند در کیفیت پاسخ ایمنی اکتسابی و به تبع آن خاطره ایمنولوژیک ایجاد شده تاثیرگذار باشند. سلول های عرضه کننده آنتی ژن یکی از عوامل سیستم ایمنی ذاتی می باشند که یقیناً در کیفیت و کمیت این پاسخ ها موثرند، (۸،۹). این در حالی است که ماهیت و ترکیب پذیرنده های راه اندازی شده روی DC می تواند سرنوشت های گوناگونی را در سلول های T تمایز دهنده رقم بزند، (۱۰). از طرف دیگر منشاء ورود آنتی ژن به بدن و چگونگی مواجهه آن با سیستم دفاعی بسیار مهم بوده زیرا سلول های B مختلفی با توجه به منشاء ورود آنتی ژن تحریک می گردند. لذا وقتی آنتی

کزاز و بوتولینوم به ترتیب خاطره ۱۰ و ۲ ساله را به وجود می آورند. پروتئین های نوترکیب THC و BONT/Hc قسمت اصلی ایمونوژن این دو توکسوئید می باشند. تیترا آنتی بادی تولیدی توسط هر کدام از پروتئین های نوترکیب THC و BONT/Hc تفاوتی آشکار را نشان می دهد. این تفاوت می تواند به دلیل تفاوت های ساختاری این دو پروتئین باشد و تیترا آنتی بادی ناشی از هر کدام ممکن است در ایجاد خاطره ایمنی تاثیرگذار باشد. این احتمال با یافته های گالی گرازیا و همکاران مبنی بر این که به دنبال تیترا آنتی - بادی زیاد می توان خاطره ایمنی طولانی تری را انتظار داشت تطابق دارد، (۱۲). بنا بر این به نظر می آید تیترا آنتی بادی اولین گام در ایجاد پاسخی موثر در میزبان است و می تواند رابطه ای مستقیم با خاطره برقرار نماید که البته این فرضیه نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نقشی قابل توجه در به وجود آوردن پاسخ ایمنی اولیه مناسب (تیترا بالای آنتی بادی) و سپس در ایجاد خاطره ای طولانی مدت داشته باشند. در این مطالعه سعی بر این بوده است که میزان ایمنی زایی در گروه های موشی مورد مطالعه در شرایط کاملاً یکسان و البته با دو آنتی ژن هم خانواده متفاوت بررسی شوند. تمام پارامترهای به کار رفته در ایمنی زایی از جمله: میزان دوز تزریقی از هر آنتی ژن، راه ورودی آنتی ژن به بدن حیوان، نوع ادجوانت استفاده شده، فاصله زمانی بین تزریق ها و... مواردی بودند که جهت یکسان سازی شرایط ایمنی زایی مورد نظر قرار گرفتند. به همین دلیل می توان گفت، تفاوت ایجاد شده در پاسخ ایمنی (اعم از میزان تیترا آنتی بادی و خاطره سلولی) توسط هر گروه احتمالاً به خاطر ساختار متفاوت آنتی ژن های THC و BONT/Hc می باشد. توکسوئیدهای

#### References

1-Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of Tetanus toxin: New insights into its neuronal signaling pathway. *Int J Mol Sci* 2012;13:6883-901.

2-Toivonen JM, Oliván S, Osta R. Tetanus toxin C-fragment: The courier and the cure? *Toxins* 2010;2:2622-44.

3-Bruggemanna H, Gottschalkb G. Insights in metabolism and toxin production from the complete genome sequence of *Clostridium tetani*. *Anaerobe* 2004;10:53-68.

4-Fatemi S, Yari K, Tavalaei M, Kahrizi D. [Purification of C-terminal fragment of the recombinant botulinum neurotoxin in *E. coli*]. *Botulinum* 2011;16:36-44. (Persian)

5-Tavallaie M, Alexander CH, Daniel G, Yannik P, Maria M, Maryse G, et al. Interaction between two sub domain of the c-terminal part of the BONA is essential for generation of protective antibodies. *FEBS Lett* 2004;572:299-306.

6-Zdanovsky AG, Zdanovskaia MV. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. *Appl Environ Microb* 2000;66:3166-73.

7-Yu YZ, Li N, Zhu HQ, Wang RL, Du Y, Wang S, et al. The recombinant Hc subunit of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A is an effective botulism vaccine candidate. *Vaccine* 2009;27:2816-22.

8-Hauser D, Gibert M, Marvaud JC, Eklund MW, Popoff MR. Botulinum neurotoxin Cl complex genes, clostridial neurotoxin homology and genetic transfer in *Clostridium botulinum*. *Turimn* 1995;33:515-26.

9-Nayak R, Lal G, Shaila M. Perpetuation of immunological memory: role of serum antibodies and accessory cells. *Microbes Infect* 2005;7:1276-83.

10-Farber D. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall. *Semin Immunol* 2009;21:84-91.

11-Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From Vaccines to Memory and Back. *Immunity* 2010;33:45-51.

12-Lanzavecchia A, Sallusto F. Human B cell memory. *Curr Opin Immunol* 2009;21:298-304.

13-Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *PNAS* 2007;104:3984-9.

## Survey and Comparison of Immunization Scale of The Recombinant Proteins of Attachment Subunit of Tetanus and Botulinom(A) Toxins

Rezaie E<sup>1,3</sup>, Miri A<sup>1,5</sup>, Salimian J<sup>2\*</sup>, Olad G.H<sup>3</sup>, Saadati M<sup>1,3</sup>, Ebrahimi M<sup>4</sup>, Boostani H<sup>6</sup>

(Received: 4 may.2013

Accepted: 12 August,2013)

### Abstract

**Introduction:** The only presented vaccine against tetanospasmin (the main factor of the fatal disease tetanus) is its toxoid which creates a 10-year period immunization. However, the botulinum toxoid (the main factor of the fetal disease botulism) only creates a 2-year period immunization. These two toxins have 36% homology and are falling into one family but are different in immunological memory, the scale of humoral immunity response and probably the scale of antibody production. The goal of this study was to compare the immunization and antibody titer of fragment C of both tetanus toxin (THc) and botulinom type A (BONT/A-Hc).

**Materials & Methods:** Expression of the recombinant proteins, THc and BONT/A-Hc, was accomplished by using of the transgenic host, E.coli BL21 DE3 and the pET28a vectors which contained the two genes in an optimum condition. Both the mentioned proteins were derived and purified from the solution phase of cell extract

and were evaluated on SDS-PAGE gel. Finally, the antibody titer containing in the serum of immunized animals with each of the aforementioned proteins, was investigated and compared by immunoassay test.

**Findings:** The result of SDS-PAGE gel evaluation showed a proper expression and purification of both the recombinant proteins, THc and BONT/A-Hc, in solution phase of cell extract. The immunoassay results of serum showed that the antibody titer against the recombinant protein of THc was more than those for the recombinant protein of BONT/A-Hc.

**Discussion & Conclusion:** It is conceived that the significant differences in the antibody titer can be related to the longevity of memory cells. However, the result needs more studies.

**Keywords:** antibody titer, immunization, memory cell, tetanus toxin, botulinom toxin

1. Dept of biology science, Faculty of science, Imam Hosein University, Tehran, Iran

2. Applied Microbiology Research center, Baqiatallah University of Medical Science, Tehran, Iran

3. Applied Biotechnology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Dept of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran

5. Human genetic Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6. Dept of Hematology, Faculty of Allid Medical Sciences, Ilam, Iran

\* (corresponding author)