

همراهی پلی مورفیسم ژن CCL2 با استعداد ابتلا به بیماری هנוخ شوئن لاین در جمعیت شمال غرب ایران

مرتضی بنیادی^{۱*}، طاهره محمدیان^۲، ماندانا رفیعی^۳، مهناز صادقی شبستری^۴، فخرالسادات مرتضوی^۵

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۷/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

چکیده

پیش زمینه و هدف: بیماری هנוخ شوئن لاین پورپورا یک بیماری خودالتهابی و واسکولیت عروق خونی کوچک بوده که غالباً در کودکان بروز می‌دهد. از علائم این بیماری وجود حساسیت پوستی به صورت پتشی و پورپورا، درگیری سیستم گوارش شامل شکم‌درد و خون‌ریزی گوارشی و آرتریت می‌باشد. مطالعات انجام‌شده نشانگر دخالت فاکتورهای عفونی و ژنتیکی در ابتلا به این بیماری می‌باشد. با توجه به اینکه در این بیماری خودالتهابی سایتوکاین‌ها نقش مهمی برعهده دارند یکی از ژن‌های کدکننده کموکاین‌ها، CCL2، در مبتلایان به هנוخ شوئن لاین در جمعیت شمال غرب کشور مورد مطالعه قرار گرفت. برای نیل به این هدف پلی مورفیسم پروموتری این ژن مورد بررسی مولکولی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۴۰ نفر مبتلا به هנוخ شوئن لاین توسط متخصصین ایمونولوژی و آلرژی به مرکز ژنتیک تبریز ارجاع داده شده و پس از خون‌گیری و استخراج DNA بررسی مولکولی با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی منطقه پروموتری ژن CCL2 مورد نظر در مقایسه با ۵۰ نفر فرد شاهد بدون سابقه بیماری صورت پذیرفت. **یافته‌ها:** بررسی‌های آماری نشانگر ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم پروموتری ژن CCL2 و استعداد ابتلا به بیماری هנוخ شوئن لاین را نشان داد به طوری که افزایش فرکانس ژنوتیپ TT و TC و فرکانس آللی T این پلی مورفیسم در گروه بیماران به طور معنی‌داری بالا بود. در حالی که فرکانس ژنوتیپ CC و فرکانس آللی C به طور معنی‌داری در این گروه پایین بود.

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم CCL2 C-۲۵۱۸T بر استعداد ابتلا به بیماری هנוخ شوئن لاین در منطقه شمال غرب ایران نقش دارد.

کلمات کلیدی: هנוخ شوئن لاین، سایتوکاین، پلی مورفیسم، واسکولیت، CCL2

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره یازدهم، ص ۹۹۸-۱۰۰۴، بهمن ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، مرکز تحقیقات سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، تلفن: ۰۴۱۱۳۳۵۷۶۲۲

Email: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

مقدمه

برخورد می‌کنند پروسه ایجاد بیماری شروع می‌شود. ماهیت این عوامل محرک خارجی دقیقاً مشخص نیست ولی فاکتورهای عفونی می‌توانند جزو این محرک‌های محسوب شوند (۲). آزمون تشخیصی خاصی برای بیماری هנוخ وجود ندارد و متخصصین با توجه به تظاهرات کلینیکی آن را تشخیص می‌دهند. در این بیماری درگیری سیستم ایمنی به صورت ته نشست ایمونوگلوبین A در بیوپسی بافتی مشاهده می‌شود.

هנוخ شوئن لاین (HSP) رایج‌ترین بیماری مربوط به واسکولیت عروق خونی کوچک می‌باشد که غالباً در کودکان دیده می‌شود. این بیماری با بروز سالانه ۲۰-۱۸ مورد از هر ۱۰۰۰۰۰ کودک اکثراً در فصل‌های پاییز و زمستان اتفاق می‌افتد (۱). هنوز مسائل بسیاری درباره این بیماری به صورت ناشناخته باقی مانده است اما تصور می‌شود که کودکانی که استعداد ژنتیکی برای ابتلا به این بیماری دارند زمانی که با یک عامل محرک خارجی

^۱ دکترای ژنتیک پزشکی، دانشیار دانشگاه تبریز، قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز و مرکز تحقیقات سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ استاد گروه کودکان دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشیار مرکز تحقیقات ریه و کلینیک ایمونولوژی و آلرژی TB، بیمارستان کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز، بیمارستان کودکان تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

با استفاده از روش RFLP ژنوتیپ افراد در جایگاه پلی مورفیک مربوطه تعیین گردید.

مواد مورد استفاده در هر واکنش شامل ۱ μl از دو پرایمر جلوبرنده و معکوس (10PM)، 0.5^{μM} از dNTP (10mM)، 0.8^{μM} از Tag DNA (50Mm MgCl₂)، 0.18^{μM} از polymerase (10X)، 3.5^{μM} از DNA می باشد که با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ رسانیده شد. شرایط دمایی ترموسایکل (ABI 22500) پس از بهینه سازی شامل موارد زیر بود: دمای واسرشته شدن اولیه ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل سازی نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. محصول PCR به دست آمده توسط آنزیم محدودگر PvuII (Fermentase) به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه در بن ماری قرار داده شد. محصولات هضم آنزیمی شده PCR بر روی ژل آکریل ۱۰ درصد الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در نور UV مشاهده شدند. آنزیم PvuII زمانی که آلل C در این جایگاه وجود دارد برش را انجام می دهد و دو قطعه ۱۲۱ بازی و ۱۷۲ بازی را تولید می کند؛ بنابراین در نمونه هایی با ژنوتیپ CC دو باند فوق الذکر و در ژنوتیپ TC سه باند ۲۹۷، ۱۲۱ و ۱۷۲ بازی مشاهده گردید (شکل ۱). برای اطمینان از صحت نتایج به دست آمده از روش RFLP، تعدادی از محصولات با استفاده از روش sequencing مورد تأیید قرار گرفته شدند.

تفاوت های ژنوتیپی و آللی موجود در میان گروه بیمار و کنترل با استفاده از آزمون فیشر و کای دو، بر حسب نیاز، مورد بررسی قرار گرفت. p value کمتر از ۰.۰۵ به صورت نتایج معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته ها

برای بررسی پلی مورفیسم C-2518T در ژن CCL2 ۴۰ کودک مبتلا به بیماری HSP و ۵۰ نفر فرد سالم به عنوان کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۴۰ نفر بیمار ۱۶ نفر مذکر و ۲۴ نفر مؤنث بودند. طیف سنی افراد مبتلا بین ۴ تا ۱۳ سال بود. توزیع ژنوتیپی بین گروه کنترل و بیمار بررسی شد و مشاهده شد که فرکانس TT و TC به طور معنی داری در گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل بالا بود (۶۵ درصد و ۳۲٫۵ درصد در مقایسه با ۴۴/۰ و ۴۴/۰) در حالی که فرکانس ژنوتیپی افراد با ژنوتیپ CC به طور معنی داری در این گروه پایین بود (۵ درصد در مقایسه با ۱۲ درصد). نتایج بررسی ها بر روی فرکانس آللی حاکی از بالا بودن معنی دار آلل T در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل در این

راش های پورپوریک در اندام های تحتانی عمده ترین یافته های کلینیکی در بیماران مبتلا به HSP می باشد. علائم مفصلی و شکمی هم غالباً در مرحله حاد بیماری همراه با شواهدی از درگیری کلیوی که با حضور خون یا پروتئین در ادرار بروز می کند دیده می شود (۲).

کموکاین ها خانواده ای از سایتوکاین های کموتراکتنت ۱ را تشکیل می دهند که همراه با سایتوکاین ها و پروتازها برای مهاجرت مستقیم لوکوسیت ها در طول پروسه التهابی ضروری هستند (۳). کموکاین ها پروتئین های اتصال یابنده به هپارین هستند که خانواده بزرگی از پپتیدها را می سازند، از لحاظ ساختاری مربوط به سایتوکاین ها هستند که عملکرد اصلی شان تنظیم تبادلات بین سلولی است و نقش مهمی در فراخوانی مونوسیت ها، نوتروفیل ها و لنفوسیت ها دارند (۴).

Ccl2 یکی از کموکاین های انسانی از خانواده کموکاین های CC می باشد که ژن کدکننده این کموکاین بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ قرار گرفته است (۴).

تنوع ژنتیکی در ژن های التهابی از جمله پلی مورفیسم های ژن های TGFβ, VEGF, IL1B, IL1RA, ICAM1, IL8, در استعداد ابتلا به بیماری یا تظاهرات کلینیکی مربوط به بیماری هنوخ مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۵).

نقش کمو^۱ کائنها در بسیاری از بیماری های روماتیسمی و واسکولیتی مثل بیماری کاوازاکی، بهجت و روماتیسم پلی میاگیا ۲ بررسی شده است (۱۱-۱۳).

هدف ما در این مطالعه بررسی تأثیر پلی مورفیسم پروموتری C-2518T ژن CCL2 بر استعداد ابتلا به بیماری هنوخ شوئن لاین می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه که به صورت کنترل - شاهد انجام شد از ۴۰ نفر بیمار مبتلا به هنوخ شوئن لاین که توسط متخصصین آلرژی و ایمنولوژی به مرکز ژنتیک معرفی شده بودند خون گیری شد. گروه کنترل را ۵۰ نفر بزرگسال بدون سابقه ابتلا به بیماری های التهابی، ایمنولوژیکی تشکیل می دادند. هر دو گروه کنترل و بیمار از جمعیت شمال غرب ایران بودند. فرم رضایت توسط خانواده بیماران تکمیل شد.

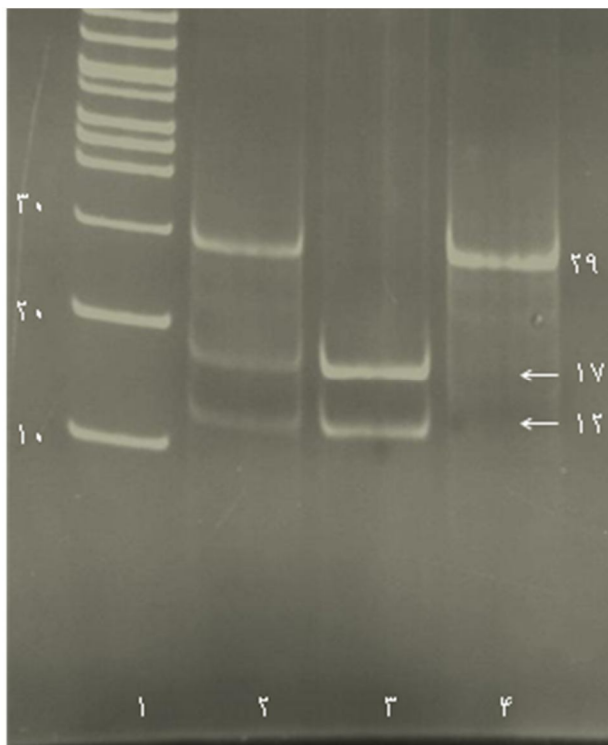
DNA ژنومی از گلبول سفید خون افراد، با استفاده از پروتکل استاندارد استخراج DNA اجماع آوری گردید. DNA حاصل با استفاده از روش PCR و پرایمرهای طراحی شده تکثیر گردید و

¹ chemotactic cytokines

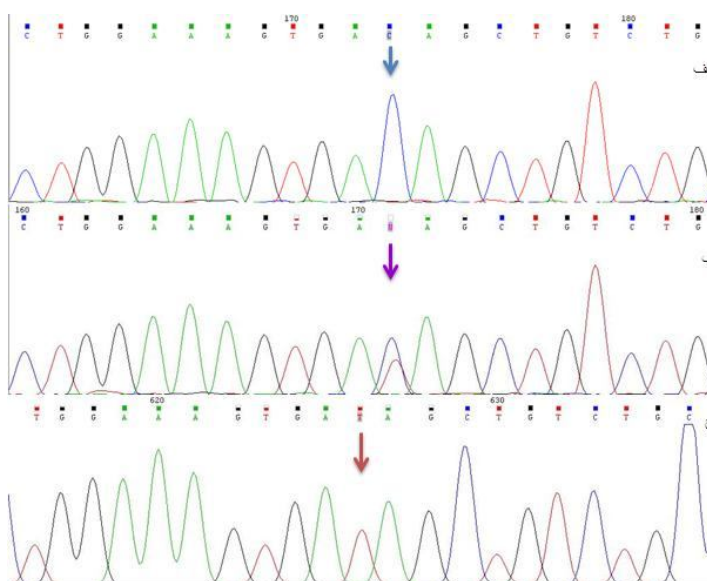
² polymyalgia rheumatic

از نمونه‌ها به روش sequencing توالی یابی شدند که نمونه ای از آن در شکل شماره دو آورده شده است.

جمعیت بود (۸۲ درصد در مقایسه با ۱۸ درصد). نتایج حاصل از بررسی‌های آماری در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که قبلاً اشاره شد برای اطمینان از صحت ژنوتیپ های تعیین شده تعدادی



شکل (۱): محصولات RFLP-PCR پلی مورفیسم T 2518-C ژن 1. CCL2. مارکر ۲: ژنوتیپ 3 CT: ژنوتیپ 4 CC: ژنوتیپ TT



شکل (۲): نتایج حاصل از توالی یابی ژن CCL2 در جایگاه ۲۵۱۸: الف) ژنوتیپ CC (ب) ژنوتیپ TC (ج) ژنوتیپ TT

جدول (۱): توزیع ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم T-۲۵۱۸ C- بین گروه کنترل و بیمار

P value	ratio Odds	کنترل (n=50) تعداد درصد	بیمار (n=30) تعداد درصد	ژنوتیپ ها
×۰/۰۰۲	۲/۳۶۴	۴۴ ۲۲	۲۶ ۶۵	TT
×۰/۰۰۴	۰/۱۸۸	۱۲ ۶	۱۲ ۵	CC
×۰/۰۴۷	۰/۶۱۳	۴۴ ۲۲	۱۳ ۳۲،۵	TC
				آلل ها
×۰/۰۰۴	۰/۴۲۹	۶۶ ۶۶	۶۵ ۸۱،۲۵	T
×۰/۰۰۶	۰/۴۴۸	۳۴ ۳۴	۱۵ ۱۵	C

× مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شده است.

بحث

پورپورای هنوخ شوئن لاین یک واسکولیت غالب دوران کودکی می باشد که به ندرت در بزرگسالان دیده می شود. اتیولوژی بیماری HSP مشخص نمی باشد و فاکتورهای بسیاری در آن دخیل می باشند. عوامل ژنتیکی به عنوان یک فاکتور احتمالی در استعداد ابتلا به این بیماری بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله ژن های کاندید که تا کنون مطالعه شده اند ژن های خانواده HLA، ژن MEFV و ژن های سایتو کائنها می باشد (۱۴). حساسیت افزایش یافته به HSP در میان بیماران آنتی ژن لکوسیتی انسانی HLA-DRB1*01 یافت شده است. نقش ژن MEFV در این بیماری و سایر بیماری های التهابی بسیار مطالعه شده است. در این مطالعات افراد مبتلا به HSP از جمعیت های مختلف درصد بالایی از جهش در ژن MEFV را نشان داده اند (۱۵-۱۸).

Yao-Hsu Yang و همکارانش نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ TT ژن TGF-β-509 در کودکان چینی مبتلا به هنوخ بالا می باشد. (۱۰). یک گروه اسپانیایی نشان داده است که پلی مورفیسم پروموتری NOS2A با ریسک ابتلا به بیماری در ارتباط است (۲۰، ۱۹). افزایش شدت درگیری کلیوی در بیماران HSP که حامل آلل T در جایگاه ۵۱۱- ژن IL-1B هستند مشاهده شده است (۵). ارتباط پلی مورفیسم ژن IL-8 با آلل A با ریسک ابتلا به این بیماری گزارش شده است. (۷) همچنین

شواهدی از نقش VEGF (پلی مورفیسم های 1154 G→A و -634 G→C) در ایجاد HSP وجود دارد (۹). MCP1 یکی از اعضای خانواده کموکاین ها می باشد که عملکرد آن ها تحریک انواع لکوسیت ها می باشد. یافته های Hsin- Hui Yu و همکارانش نشان می دهد که کموکاین های پیش التهابی در بیماری زایی HSP نقش دارند. نتایج مطالعات آن ها که در جمعیت چین انجام شده است پلی مورفیسم C-2518T CCL2 را به عنوان یک فاکتور ریسک در استعداد ابتلا به بیماری HSP معرفی می کند (۲۱). نتایج مطالعه حاضر که برای اولین بار بر روی جمعیت ایران در شمال غرب کشور انجام شده با تأیید نتایج این گروه، ارتباط پلی مورفیسم C-2518T CCL2 با این بیماری را در این جمعیت نیز نشان می دهد.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان می دهد که پلی مورفیسم C-۲۵۱۸T ژن کموکاین MCP1 به عنوان عضوی از خانواده کموکاین ها که نقش مهمی در فرایند التهاب دارند در استعداد ابتلا به بیماری هنوخ درگیر می باشد و می توان با انجام کارهای گسترده از جمله اندازه گیری سطح این کموکاین در بیماران نقش این کموکاین را بیشتر مورد مطالعه قرار داد. همین طور با تکرار این آزمایش در جمعیت های مختلف می توان تأثیر این پلی مورفیسم را بیشتر بررسی کرد.

References:

1. Yao HY, Ya HC, Li CW, Hsin YH, M EG, Bor LC, The immunobiology of Henoch-Schönlein purpura. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7:179-84.

2. Smith G. Management of Henoch-Schönlein purpura. *Paediatrics and Child Health* 2008;18(8):358-63.

3. Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Re* 1096;26: 211-23.
4. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29(6):313–26.
5. Amoli MM, Calviño MC, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Ollier WER, Gonzalez-Gay MA. Interleukin 1beta gene polymorphism association with severe renal manifestations and renal sequelae in Henoch-Schönlein purpura. *J Rheumatol* 2004;31(2):295–8.
6. Amoli MM, Matthey DL, Calvino MC, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH, et al. Polymorphism at codon 469 of the intercellular adhesion molecule-1 locus is associated with protection against severe gastrointestinal complications in Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol* 2001;28:1014e8.
7. Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, et al. Interleukin 8 gene polymorphism is associated with increased risk of nephritis in cutaneous vasculitis. *J Rheumatol* 2002;29:2367e70.
8. Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, et al. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with severe renal involvement and renal sequelae in Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol* 2002;29:1404e7.
9. Rueda B, Perez-Armengol C, Lopez-Lopez S, Garcia-Porrúa C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Association between functional haplotypes of vascular endothelial growth factor and renal complications in Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol* 2006;33:69e73.
10. Yang YH, Lai HJ, Kao CK, Lin YT, Chiang BL. The association between transforming growth factor-beta gene promoter C-509T polymorphism and Chinese children with Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2004;19:972e5.
11. Wong M, Silverman ED, Fish EN. Evidence for RANTES, monocyte chemotactic protein-1, and macrophage inflammatory protein-1 beta expression in Kawasaki disease. *J Rheumatol* 1997;24:1179e85.
12. Bozoglu E, Dinc A, Erdem H, Pay S, Simsek I, Kocar IH. Vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in Behcet's patients with venous thrombosis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S42e8.
13. Ellingsen T, Elling P, Olson A, Elling H, Baandrup U, Matsushima K, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in temporal arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2000;59:775e80.
14. Rigante D, Castellazzi L, Bosco A, Esposito S. Is there a crossroad between infections, genetics, and Henoch-Schönlein purpura? *Autoimmun Rev* 2013;12(10):1016–21.
15. Yurtcu E1, Gokcan H, Yilmaz U, Sahin FI. Detection of MEFV gene mutations in patients with inflammatory bowel disease. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009;13:87-90
16. Villani A-C, Lemire M, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Fortin G, et al. Genetic variation in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) and risk for Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS ONE* 2009;4(9):e7154.
17. Baruch R, Broza Y, Brik R. Prevalence and significance of mutations in the familial Mediterranean fever gene in henoch-schonlein purpura. *J Pediatr* 2003;143:658-61.
18. He X, Lu H, Kang S, Luan J, Liu Z, Yin W, et al. MEFV E148Q polymorphism is associated with Henoch-Schönlein purpura in Chinese children. *Pediatr Nephrol* 25(10):2077-82.

19. Demircin G, Oner A, Unver Y, Bulbul M, Erdogan O. Erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma malondialdehyde levels in children with Henoch Schonlein purpura. *Acta Paediatr* 1998;87:848–52.
20. Martin J, Paco L, Ruiz MP, Lopez MA, Garcia-PC, Amoli MM, et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to Henoch-Schonlein purpura in northwestern Spain. *J Rheumatol* 2005;32:1081–5.
21. Yu H-H, Liu P-H, Yang Y-H, Lee J-H, Wang L-C, Chen W-J, et al. Chemokine MCP1/CCL2 and RANTES/CCL5 gene polymorphisms influence Henoch-Schönlein purpura susceptibility and severity. *J Formosan Med Assoc* 2013;12(7):1–6.

ASSOCIATION OF CHEMOKINE CCL2 GENE POLYMORPHISM WITH HENOCH SCHONLEIN PURPURA DISEASE IN NORTH-WEST OF IRAN

Mortaza Bonyadi^{1*}, Tahereh Mohammadian², Mandana Rafeey³,
Mahnaz Sadeghi Shabestari⁴, Fakhrossadat Mortazavi⁵

Received: 30 Sep , 2014; Accepted: 3 Dec , 201

Abstract

Background & Aims: Henoch–Schönlein purpura (HSP) is an autoinflammatory disease and systemic small vessel vasculitis that more frequently occurs in children. It is characterized by skin lesion such as Petechia and purpura, gastrointestinal involvement including abdominal pain and gastrointestinal bleeding and arthritis. Studies have shown that HSP could be due to different infections and genetic factors. Based on the fact that cytokines have important role in this inflammatory disease, CCL2- a chemokine encoding gene- is studied in HSP patients from northwestern Iran. To achieve this goal molecular analysis of polymorphism located in promoter region of this gene is performed.

Materials & Methods: This study was conducted on 40 HSP patients who were referred by immunology and allergy specialists to Genetic Center of Tabriz and after blood sampling and DNA extraction, molecular analysis with PCR-RFLP method was performed to genotype polymorphic region of promoter region of this gene. The results were compared to that of 50 ethnic-sex matched control healthy people.

Results: Statistical analysis shows significant association of this polymorphism with development of Henoch–Schönlein purpura disease in this cohort. The frequency of TT and TC genotypes and T allele of CCL2 -C2518T gene polymorphism were significantly higher in HSP patients.

Conclusion: CCL2 C-2518T gene polymorphisms were associated with susceptibility to HSP in Northwestern Iran.

Keywords: Henoch Schönlein purpura, Cytokines, Polymorphism, Vasculitis, CCL2

Address: Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Tel:+98 4133357622

Email: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(11): 1004 ISSN: 1027-3727

¹ PhD, Center of Excellence for Biodiversity, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran / Pediatric Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences (Corresponding Author)

² Msc Student, Center of Excellence for Biodiversity, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, / Liver and Gastrointestinal Disease Research Center, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

³ PhD, Liver and Gastrointestinal Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ PhD, Associate Professor of Clinical Immunology and Allergy TB and Lung Research Center, Children Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ PhD, Children Hospital, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran