

ارتباط پروتئینهای فاز حاد با ایزوتیپهای فاکتور روماتوئید در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

چکیده

دکتر فاضل شکری I

* قاسم مسیبی II

محمد رفیعی III

آرتریت روماتوئید (RA, Rheumatoid Arthritis) یک بیماری خود ایمن است که یکی از معیارهای تشخیصی آن وجود فاکتور روماتوئید (Rheumatoid Factor, RF) در سرم بیماران می باشد. مطالعات نشان داده اند که بین بیماران آرتریت روماتوئید RF^+ و RF^- از نظر تظاهرات بافت شناسی (histologic) اختلافاتی وجود دارد. در این مطالعه میزان C-Reactive Protein (CRP) و ایزوتیپهای IgA RF و IgM RF در ۴۵ بیمار مبتلا به RA مورد سنجش قرار گرفت.

بر اساس آزمایش RF-Latex بیماران RA به دو گروه Seropositive-RA (SP-RA, RF^+) و Seronegative-RA (SN-RA, RF^-) تقسیم بندی شدند. نتایج بیانگر آن بود که میزان CRP در SP-RA بطور معنی داری بیشتر از SN-RA بود ($P < 0.0001$). همچنین آنالیز آماری نتایج نشان داد که همبستگی بین CRP با IgA RF ($r = 0.59, P < 0.0001$) در مقایسه با همبستگی آن با IgM RF ($r = 0.47, P < 0.004$) بیشتر است. می توان نتیجه گیری نمود که بین CRP و RF ارتباط وجود دارد. افزایش معنی دار این ارتباط با تیتراهای بالاتر IgA RF احتمالاً می تواند انعکاسی از شدت بیشتر بیماری در بیماران IgA RF^+ باشد.

کلید واژه ها: ۱- آرتریت روماتوئید ۲- فاکتور روماتوئید ۳- پروتئینهای فاز حاد

مقدمه

ایمونولوژیکی RA تولید فراوان یک نوع اتوآنتی بادی است. این اتوآنتی بادی که برای قسمت F_c مولکول IgG ویژگی دارد، فاکتور روماتوئید (Rheumatoid Factor, RF) نامیده می شود. تیترا بالای RF در سرم بیش از ۹۰-۸۰ درصد بیماران مبتلا به RA وجود دارد (۲). RF می تواند از ایزوتیپهای مختلف (IgG, IgA, IgM و حتی IgE) باشد (۳). برخی از مطالعات نشان می دهند که شدت بیماری و علایم خارج مفصلی در بیماران RF^+ (Seropositive) در مقایسه با بیماران RF^- (Seronegative) بیشتر است (۴).

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis, RA) یک بیماری التهابی مزمن است که در مراحل اولیه مفاصل کوچک و بزرگ را گرفتار می سازد. این بیماری جزو بیماریهای اتوایمیون سیستمیک می باشد که عامل اتیولوژیکی آن مشخص نمی باشد. عوامل محیطی و ژنتیکی در مستعد نمودن فرد در ابتلا به بیماری نقش دارند. نسبت ابتلا در زنان بیشتر از مردان است و افرادی که از نظر ژنتیکی دارای HLA-DR4 و یا HLA-DW4 می باشند نسبت به این بیماری آسیب پذیرترند (۱). یکی از مشخصات

این مقاله در قالب طرح پژوهشی در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اراک به ثبت رسیده است.

(I) دانشیار ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، بخش ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، تهران.

(II) کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اراک، اراک، (*مؤلف مسؤول).

(III) کارشناس ارشد آمار حیاتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اراک، اراک.

۱۳۷۸) اضافه گردید و با اپلیکاتور چوبی مخلوط شد. بعد از ۳ دقیقه نتیجه در زیر نور چراغ مطالعه بررسی شد. در صورت وجود آگلوتیناسیون شدت آن از ۱+ تا ۴+ گزارش گردید.

براساس روش RF-Latex بیماران مبتلا به RA به دو گروه RF⁽⁺⁾ (SP-RA, Seropositive RA) و RF⁽⁻⁾ (SN-RP, Seronegative RA) تقسیم بندی شدند. از ۴۵ بیمار مبتلا به RA، ۳۵ نفر RF⁺ و ۱۰ نفر RF⁻ بودند. حدود ۶۵٪ بیماران (۲۹ نفر) زن و ۳۵٪ آنان (۱۶ نفر) نیز مرد بودند (جدول شماره ۱).

اندازه گیری غلظت فاکتور روماتوئید به روش ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) - غلظت فاکتور روماتوئید از کلاسهای IgA RF و IgM RF با روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت (۸). این روش به اختصار شامل مراحل زیر بود:

۱- میکروپلیت الیزا (Nunc; Denmark No: 018267) بوسیله Human IgG (غلظت ۲۰ ug/ml) پوشیده شد.

۲- در مرحله بعد نمونه ها با رقت مشخص بصورت duplicate به حفره ها اضافه شدند.

۳- رقت مناسب از کونژوگه های اختصاصی ضد IgM و IgA (F(ab) 2HRP-Goat-anti-human IgM&IgA: sigma) به نمونه ها اضافه گردید.

۴- با اضافه کردن سوبسترای O-Phenyl Diamine جذب نوری در طول موج ۴۹۲ mm خوانده شد و غلظت RF در نمونه ها از روی منحنی استاندارد اندازه گیری گردید (لازم به توضیح است که در پایان هر مرحله بمدت

علت این امر را به تشکیل کمپلکسهای ایمنی در بیماران RF⁺ نسبت می دهند (۵). همچنین میزان برخی از پروتئینها از جمله اجزاء کمپلمان و پروتئینهای فاز حاد در این بیماران تغییر می کند (۶). احتمالاً ما بین بیماران مبتلا به RA که Seropositive می باشد و آنها که Seronegative هستند از نظر تظاهرات کلینیکی تفاوتی وجود دارد (۷). بر این اساس در این مطالعه دو گروه از بیماران مبتلا به روماتوئید آرتریت (RF⁺ و RF⁻) انتخاب شدند و میزان C-Reactive Protein (CRP) در این دو گروه و ارتباط آن با غلظت ایزوتیپهای RF در سرم و مایع مفصل مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

نمونه های مورد آزمایش - بعد از تشخیص قطعی بیماری (تایید شده توسط پزشک معالج) بطور تصادفی از بین بیماران مبتلا به RA نمونه های سرم و مایع مفصل زانو ۴۵ بیمار جمع آوری و تا زمان انجام آزمایش تحت دمای ۲۰°C نگهداری شدند.

سنجش فاکتور روماتوئید با روش لاتکس - RF (RF-Latex) - ابتدا سرم بیماران بمدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۶°C در بن ماری قرار گرفت تا جزء کمپلمان آن غیرفعال شود. سپس سرم بیمار با بافر فسفات ۰/۱۵ مولار (PH=۷/۲) تا تیتراژ ۱:۲۰ رقیق گردید. سپس بر روی یک لام زمینه سیاه، یک قطره از سرم رقیق شده بیمار، یک قطره از سرم کنترل مثبت و یک قطره از سرم کنترل منفی - بطور جداگانه - قرار داده شد و به هر نمونه یک قطره آنتی ژن لاتکس (ساخت شرکت ایران پژوهان - سری ۴۷۱۱۰، سال

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی جنس، میانگین سن، مدت بیماری و طول مدت درمان در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

گروه بیماران	تعداد	جنس		میانگین سنی (سال)	مدت بیماری (سال)	طول مدت درمان (ماه)
		مؤنث	مذکر			
SP-RA*	۳۵	۲۳	۱۲	۴۸ ± ۱۲/۴	۶ ± ۴/۵	۱۴ ± ۱۲
SN-RA**	۱۰	۶	۴	۴۱/۷ ± ۲۰	۷/۵ ± ۱۱	۶۱ ± ۹۸

* Seropositive-RA ** Seronegative-RA

اعداد بصورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده اند

نتایج

غلظت فاکتور روماتوئید از کلاس IgM RF و IgA RF در سرم و مایع مفصل بیماران RA با روش ELISA مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت RF در سرم با مایع مفصل تفاوت نداشت. از نظر میانگین غلظت IgM RF و IgA RF بین بیماران SP-RA و بیماران SN-RA اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.001$) (جدول شماره ۲). با سنجش میزان CRP در دو گروه از بیماران RA، مشخص گردید که در گروه SP-RA، ۷/۵٪ از بیماران از نظر CRP، منفی و ۳/۹۴٪ آنان مثبت (از ۱+ تا ۴+) بودند در حالیکه در گروه SN-RA، ۷۰٪ از بیماران از نظر CRP منفی و ۳۰٪ آنان مثبت (از ۱+ تا ۲+) بودند (جدول شماره ۳ و ۴).

۲ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C صورت گرفت و حفرها سه بار با بافر PBS/Tween20 شستشو داده شدند). اندازه‌گیری کیفی میزان CRP- برای اندازه‌گیری CRP از کیت شرکت ایران پژوهان (سری ۳۷۱۱۱، سال ۱۳۷۸) و بر اساس دستورالعمل مربوط به آن استفاده شد. یک قطره از سرم بیمار و سرمهای کنترل مثبت و کنترل منفی بطور جداگانه بر روی لام قرار داده شد و یک قطره CRP لاتکس (حاوی آنتی‌بادی ضد CRP متصل به ذرات لاتکس) به هر سرم اضافه شد سپس با اپلیکاتور مخلوط و بعد از دو الی پنج دقیقه نتیجه آزمایش خوانده شد. (شدت درجه آگلوتیناسیون به صورت ۱+ تا ۴+ گزارش شد).

جدول شماره ۲- میانگین غلظت IgM RF و IgA RF در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

فاکتور روماتوئید گروه بیماران	IgM RF ($\mu\text{g/ml}$)		IgA RF ($\mu\text{g/ml}$)	
	سرم	مایع مفصل	سرم	مایع مفصل
SP-RA* (n=۳۵)	121 ± 120	120 ± 145	74 ± 89	76 ± 78
SN-RA** (n=۱۰)	$4/3 \pm 8/2$	$3/0.6 \pm 6$	$2/8 \pm 5$	$2/4 \pm 2/6$

* Seropositive-RA ** Seronegative-RA

اعداد بصورت انحراف معیار \pm میانگین ذکر شده‌اند

جدول شماره ۳- رابطه شدت آگلوتیناسیون CRP و غلظت فاکتور روماتوئید در سرم مبتلایان به آرتریت روماتوئید

غلظت RF در سرم ($\mu\text{g/ml}$)	درجه آگلوتیناسیون CRP در سرم	درجه آگلوتیناسیون CRP در سرم				
		۰	+۱	+۲	+۳	+۴
SP-RA*	IgMRF	۲۱	۷۰/۵	۷۶/۹	۱۰۷/۲	۲۰۵
	IgARF	۱۷	۲۵	۴۱/۵	۵۷/۴	۱۵۵/۴
	تعداد	(۳)	(۳)	(۶)	(۱۲)	(۱۱)
SN-RA**	IgMRF	۱/۵	۱/۴	۲/۶	-	-
	IgARF	۰/۲	۵/۵	۱/۸	-	-
	تعداد	(۷)	(۲)	(۱)		

* Seropositive-RA ** Seronegative-RA

اعداد داخل پرانتز معرف تعداد نمونه‌ها می‌باشند

جدول شماره ۴- رابطه شدت آگلوتیناسیون CRP و غلظت فاکتور روماتوئید در مایع مفصلی مبتلایان به آرتریت روماتوئید

درجه آگلوتیناسیون CRP در مایع مفصلی		۰	۱+	۲+	۳+	۴+
غلظت RF در مایع مفصلی (µg/ml)	مفصلی					
	SP-RA*	IgMRF	۱۰/۷	۴۶/۶	۱۵۵	۱۲۲
IgARF		۵	۳۸/۴	۶۸	۹۷/۵	۱۴۸
تعداد		(۲)	(۶)	(۷)	(۶)	(۱۴)
SN-RA**	IgMRF	۱/۲	۲/۵	۳	-	-
	IgARF	۱/۷	۳	۱	-	-
	تعداد	(۶)	(۳)	(۱)		

اعداد داخل پرانتز معرف تعداد نمونه‌ها می‌باشند.

* Seropositive-RA ** Seronegative-RA

مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات کلینیکی و شدت بیماری در گروه بیماران Seropositive-RA در مقایسه با گروه Seronegative-RA متفاوت است (۴). یکی از فاکتورهای که میزان آن در بیماران مبتلا به RA زیاد می‌شود CRP (C-Reactive Protein) است (۹). CRP یکی از پروتئینهای فاز حاد است که در مرحله حاد بیماریها افزایش می‌یابد. مقدار این پروتئین در سرم و مایعات بدن افراد سالم بسیار اندک است. در واکنشهای التهابی، در عفونتهای باکتریایی و ویروسی، تب روماتیسمی، سکتة قلبی حاد، سرطان، سل و آرتریت روماتوئید فعال مقدار CRP افزایش می‌یابد (۹).

در این تحقیق، میزان IgM RF و IgA RF و CRP در سرم و مایع مفصل بیماران مبتلا به RA مورد سنجش قرار گرفت و بر اساس نتایج حاصل از تست RF-Latex، بیماران به دو گروه Seropositive(RF⁺) و Seronegative(RF⁻) تقسیم شدند و آنالیز آماری بین این دو گروه صورت گرفت (جدول شماره ۱).

با اندازه‌گیری CRP در بین این دو گروه مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری بین گروه بیماران SP-RA و گروه

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که بین گروه بیماران SP-RA و گروه SN-RA اختلاف معنی‌داری از نظر میزان CRP وجود دارد ($P < 0.0001$). در گروه بیماران SP-RA، همبستگی معنی‌داری بین میزان CRP سرمی با IgM RF سرمی ($r = 0.47, P < 0.004$) و CRP مفصلی با IgM RF مفصلی ($r = 0.4, P < 0.015$) وجود دارد. همچنین همبستگی قوی میان CRP سرمی با IgA RF در سرم ($r = 0.59, P < 0.0001$) و CRP مفصلی با IgA RF در بین میزان CRP و RF با طول مدت درمان و مدت بیماری در بیماران مبتلا به RA مشاهده نشد.

بحث

بیماری آرتریت روماتوئید یکی از بیماریهای خودایمن غیرمختص به عضو با اتیولوژی ناشناخته است. از جمله معیارهای تشخیصی این بیماری، خشکی صبحگاهی مفاصل، درد و تورم مفاصل، ندولهای زیرجلدی و وجود فاکتور روماتوئید در سرم و مایع مفصل این بیماران است. RF در سرم بیش از ۹۰٪ از بیماران RA وجود دارد (۱).

بیشتر از بیمارانی است که IgM RF مثبت می‌باشند. همچنین در مطالعه‌ای که Lehtimaki و همکاران انجام دادند مشخص گردید که شدت بیماری و میزان CRP و ESR در بیماران مبتلا به RA که از نظر IgA RF مثبت هستند بیشتر می‌باشد (۱۷).

در مجموع میزان CRP در گروه بیماران SP-RA در مقایسه با گروه SN-RA بیشتر است. همچنین واکنشهای التهابی و ضایعات مفصلی و شدت بیماری در گروه SP-RA بیشتر از گروه SN-RA می‌باشد. بین میزان CRP، فاکتور روماتوئید و ایزوتیپهای IgM RF و IgA RF همبستگی معنی‌دار و مثبتی وجود دارد. بنظر می‌رسد که CRP در تشدید واکنشهای التهابی و ارتشاح سلولی در مفاصل دخالت دارد. بنابراین افزایش مقدار CRP در سرم تنها از نظر تشخیص بلکه از نظر شدت بیماری و واکنش بیمار نسبت به درمان نیز اهمیت دارد.

تشکر و قدردانی

دینوسیله از زحمات استاد ارجمند جناب آقای دکتر جعفر فرقانی‌زاده که در اجراء این پژوهش ما را یاری نمودند تقدیر می‌گردد.

منابع

- 1- Singal D.P, Green D, Reid B, et al., HLA-D region genes and rheumatoid arthritis: Ann-Rheum-Dis: 1992, 51: 23-28.
- 2- Carson D.A, Rheumatoid factors: in kelly.W.N: Harris-E.D, Ruddy-S, Sledge C.B(eds). Textbook of Rheumatology, W.B.saunders, philadelphia, 1989, PP:198-207.
- 3- Gruber B, Ballon P.D: IgE rheumatoid factors. Clin-Exp-Immunol; 1998, 71(4): 289-294.
- 4- Fujiami M, Sato K, Kashiwazaki S, et al., Caparable histological appearance of synovitis in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: Clin-Exp-Rheumatol; 1997,15(1):11-17.
- 5- Williams RC: Rheumatoid factors: Historical, prospective, origin and possible role in disease. J-Rheumatol, 1992, 19(1): 42-45.

از نظر وجود میزان این پروتئین وجود دارد بطوریکه بیش از ۹۴٪ از بیماران SP-RA واجد CRP بودند، در حالیکه تنها در حدود ۳۰٪ از بیماران گروه SN-RA از نظر CRP مثبت بودند (جدول شماره ۳ و ۴).

بنظر می‌رسد که فاکتور روماتوئید نقش مهمی در تولید CRP داشته باشد. RF قادر است با IgG کمپلکس ایمنی ایجاد نماید. این کمپلکس در بخشهای مختلف بدن از جمله غشاء مفاصل رسوب می‌نماید و با فعال نمودن سیستم کمپلمان باعث ارتشاح سلولهای دفاعی به محل می‌گردد، نتیجه آنکه واکنش التهابی در محل ایجاد می‌شود و بدنبال آن ضایعات بافتی ایجاد می‌گردد. در اثر ضایعات بافتی و تخریب سلولها، میزان CRP افزایش می‌یابد (۵).

بنظر می‌رسد ارتباط مثبتی بین میزان RF و CRP وجود داشته باشد (۱۰). همچنین می‌توان در مراحل اولیه بیماری با سنجش میزان آنها میزان پیشرفت بیماری را پیشگویی نمود (۱۱، ۱۲). برخی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش سطح CRP و RF با HLA-DRB1 ارتباط دارد (۱۳). در مطالعه‌ای که قبلا انجام پذیرفت مشخص گردید که غلظت IgM RF و IgA RF در سرم با مایع مفصل تفاوت ندارد (۱۴). در این مطالعه مشخص گردید که همبستگی بسیار قوی بین CRP سرمی و مفصلی وجود دارد ($r=0/89, P<0/0001$). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که نوع ایزوتیپ فاکتور روماتوئید در تغییرات هیستوپاتولوژیک بیماران مبتلا به RA دخالت دارد. در بیمارانی که فقط از نظر IgM RF مثبت هستند شدت ضایعات مفاصل در مقایسه با بیمارانی که از نظر IgA RF مثبت هستند کمتر است (۱۵). از طرف دیگر، در بیماران مبتلا به RA بین ضایعات استخوانی و سطح CRP ارتباط وجود دارد (۱۶).

نیز با تعیین ارتباط بین CRP و ایزوتیپهای فاکتور روماتوئید مشخص گردید که در گروه بیماران SP-RA همبستگی بین میزان CRP با IgA RF ($r=0/59, P<0/0001$) و IgM RF ($r=0/47, P<0/004$) بیشتر است. این نتایج ثابت می‌کنند که میزان CRP در بیمارانی که از نظر IgA RF مثبت هستند

- 6- matsuda Y, Yamanaka K, Higami K, et al., Time lay between active joint-inflammation and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis. *J- Rheumatol*. 1998, 25(3): 427-432.
- 7- Arvidsson NG, Gudbjornsson B, Hallgren R, et al., Concordant message of different inflammatory markers in patient with rheumatoid arthritis. *Ups-J-Med-Sci*; 1998, 103(1): 35-42.
- 8- Shokri F, Mageed R.A, Jefferis R.A, : Quantitative ELISA for measurment of rheumatoid factors associated cross-reactive idiotypes in serum from patient with rheumatoid arthritis. *Brith- J- Rheumatol*; 1993, 32(7): 862-869.
- 9- Plant M.J, Jones PW, Lewis P.A, et al., Patterns of radiological progresion in early rheumatoid arthritis. *J- Rheumatol*; 1998, 25(3): 417-426.
- 10- Palmela I, Iaasonen I, Kankaanpaa E,: Progression of cervical spine changes in patients with early rheumatoid arthritis. *J- Rheumatol*; 1997, 24(7): 1280-1284.
- 11- Amans S, Paimela L, Leirisalo M, et al., Prediction of disease progression in early rheumatoid arthritis by ICTP, RF, and CRP. *Rheumatol*, 2000, 39(9): 1009-1013.
- 12- Scott D.L: Prognostic factors in early rheumatoid arthritis. *Rheumatol*, 2000, 39 suppl 1, 24-29.
- 13- Listing J, Rau R, Muller B, et al., HLA-DRB1 genes, rheumatoid factors , and elevated C-reactive protein: independent risk factor of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *J- Rheumatol*; 2000, 27(9): 2100-2109.
- 14- Mosayyebi Gh, Forghanizadeh J, Gholestan B, et al., Differential production of IgM and IgA rheumatoid factors in peripheral blood and synovial of patients with rheumatoid arthritis. *Med-J-Islam - Repub Iran*; 1997, 11(2): 91-97.
- 15- Houssien DA, Jonsson T, Davies E, et al., Rheumatoid factor isotypes, disease activity and the outcome of rheumatoid. *Scan-J-Rheum*: 1998, 27(1): 46-53.
- 16- Plant MJ , William AL , O'Sullivan MM , et al. , Relationship between time - integrated C-reactive protein levels and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 2000, 43(7): 1473-1477.
- 17- Lehtimaki MY, Kautiainen H, et al., Hip involvement in seropositive rheumatoid arthritis. *Scan-J-Rheum*; 1998, 27(6): 406-409.

COMPARISON OF C-REACTIVE PROTEIN (CRP) LEVEL AND RHEUMATOID FACTOR ISOTYPES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

^I
F. Shokri, Ph.D *Gh. Mosayyebi, Ms ^{II}
^{III}
M. Raffei, Ms

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease. Production of Rheumatoid Factor (RF) is a characteristic feature of the majority RA patients. Previous studies showed there are differences between seropositive-RA (SP-RA) and seronegative-RA (SN-RA), regarding clinical manifestations.

In this study the level of CRP was measured in serum and synovial fluid of 45 RA patients by latex agglutination test. The concentration of IgM RF and IgA RF was also quantitated by ELISA. The patients were divided in two groups (SP-RA, n=35 and SN-RA, n=10) based on the Latex agglutination test.

The results show that the level of CRP in SP-RA was significantly higher than that of SN-RA ($p < 0.0001$). This correlation was more evident for the IgA RF ($r = 0.59$, $p < 0.0001$) as compared to the levels IgM RF ($r = 0.47$, $p < 0.004$).

These results indicated that there is correlation between CRP and RF levels. However IgA RF may be considered as a marker for disease severity.

Key Words: 1) Rheumatoid Arthritis 2) Rheumatoid Factor 3) C-Reactive Protein

This article is recorded in the undersecretary of research of Arak University of Medical Sciences and Health services.

I) Associate Professor of Immunology, School of public Health, Department of Immunology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

*II) Ms. In Immunology, Arak University of Medical Sciences and Health Services, Arak, Iran. (*Corresponding author)*

III) Ms. In Biostatistics, Arak University of Medical Sciences and Health Services, Arak, Iran.