ORIGINAL ARTICLE

Comparative Study on the Role of Serum Levels of Interleukin-6 and Interleukin-8 in Predicting the Severity of COVID-19 and Prognosis in Patients Admitted to Ghaemshahr Razi Hospital

Alireza Davoudi[1],
Sahar Azadeh[2],
Narges Najafi[3],
Bahareh Soleimanpourian[4],
Abbas Alishahi[4],
Armaghan Mokhtariani[4],
Mazaher Azordeh[5],
Reyhaneh Shojaei-Asrami[4],
Mohammad Khademloo[6],
Leila Delavarian[7],
Fatemeh Ahangarkani[8]

[1] Associate Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Resident in Infectious Diseases, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Medical Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MSc in Cellular and Molecular Biology, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[7] BSc in Nursing, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[8] Assistant Professor, Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 21, 2022 ; Accepted janary 31, 2022)

Abstract

Background and purpose: The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) resulted in a worldwide emergency. Various studies show conflicting and diverse results on the role of inflammatory cytokines in predicting the severity and prognosis in patients with COVID-19. The aim of this study was to compare the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in predicting the severity of COVID-19 and prognosis in patients admitted to Qaemshahr Razi Hospital.

Materials and methods: In this cross-sectional prospective study, the serum levels of interleukin 8 and 6 were measured in 51 patients with COVID-19 and compared with 25 healthy individuals in Qaemshahr Razi Hospital, 2021. ELISA method was used to measure these cytokines and data analysis was performed in SPSS V25.

Results: The serum levels of IL6 and IL8 in the patient group were about 4 times and 6 times higher than those of the control group, respectively. Average levels of IL-6 (P=0.004) and IL-8 (P<0.001) were significantly higher in patients with severe COVID-19 compared to moderate form and control group. There was no correlation between the duration of hospitalization and the level of IL-6 (P=0.1), while there was a significant correlation between the length of hospital stay and the level of IL-8 (P=0.012).

Conclusion: IL-6 and IL-8 serum levels in patients with COVID-19 can be helpful in predicting the severity of disease and prognosis of patients.

Keywords: COVID-19, interleukin-6, interleukin-8, prognosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (217): 124-134 (Persian).

Corresponding Author: Fatemeh Ahangarkani - Antimicrobial Resistance Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: fkani63@gmsil.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 217 بهمن سال 1401 (134-124)

بررسی مقایسه ای سطح اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 در پیش بینی شدت و پیش آگهی در بیماران کووید19 بستری شده در بیمارستان رازی قائم شهر

علیرضا داودی[1]
سحر آزاده[2]
نرگس نجفی[3]
بهاره سلیمان پوریان[4]
عباس عالیشاهی[4]
ارمغان مختاریانی[4]
مظاهر آزرده[5]
ریحانه شجاعی اسرمی[4]
محمد خادملو[6]
لیلا دلاوریان[7]
فاطمه آهنگرکانی[8]

چکیده

سابقه و هدف: پاندمی بیماری کروناویروس 2019 (کووید19) که ناشی از سندرم تنفسی شدید ویروس کرونا 2 (SARS-CoV-2) می‌باشد، منجر به یک وضعیت اضطراری در سراسر جهان شده است. مطالعات مختلف، بیانگر نتایج متضاد و متنوع نقش سایتوکاین‌های التهابی در پیش‌بینی شدت و پیش‌آگهی در بیماران کووید19 می‌باشد، لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه‌ای سطح اینترلوکین6 و اینترلوکین8 در پیش‌بینی شدت و پیش‌آگهی در بیماران کووید19 بستری شده در بیمارستان رازی قائم‌شهر بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش مقطعی آینده نگر، سطوح سرمی اینترلوکین 8 و 6 در 51 بیمار مبتلا به کووید19 در برابر 25 فرد سالم در بیمارستان آموزشی درمانی رازی قائم‌شهر در سال 1400 مورد سنجش قرار گرفت. برای اندازه‌گیری این سایتوکاین‌ها از روش ELISA و برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS25 استفاده شد.

یافته‌ها: سطوح سرمی اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 به ترتیب در گروه بیماران حدود 4 برابر و 6 برابر گروه شاهد بود. متوسط میزان اینترلوکین 6 (P=0/004) و اینترلوکین 8 (P<0/001) در بیماران مبتلا به فرم شدید کووید در قیاس با فرم متوسط و گروه شاهد بیش‌تر بوده است. ارتباطی میان مدت بستری در بیمارستان و سطح اینترلوکین 6 مشاهده نشد (P=0/1)، در صورتی‌که بین مدت زمان بستری و مقدار اینترلوکین 8 این ارتباط وجود داشت (P=0/012).

استنتاج: سطوح سرمی اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 در بیماران مبتلا به کووید19 می‌تواند در پیش‌بینی شدت بیماری و پیش‌آگهی کمک‌کننده باشد.

واژه های کلیدی: کووید19، اینترلوکین 8، اینترلوکین 6، پیش آگهی

مقدمه

در اواخر دسامبر2019 پنومونی با منشا 2019-nCoV به سرعت در سراسر جهان گسترش پیدا کرد و در مارچ2020 توسط سازمان جهانی بهداشت، اپیدمی اعلام شد(2،1).

مولف مسئول: فاطمه آهنگرکانی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی E-mail: fkani63@gmail.com
1. دانشیار، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. رزیدنت بیماری های عفونی، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. استاد، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
6. استاد، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
7. کارشناس پرستاری، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
8. استادیار، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1401/8/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1401/9/8 تاریخ تصویب : 1401/11/11

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

بیماران مبتلا به کرونا طیف وسیعی از علائم را بروز می‌دهند. در برخی از بیماران علائم درگیری ریوی خفیفی همچون انفلوانزا با تظاهرات سرفه خشک، تب، سردرد، خستگی و درد عضلانی و در برخی از بیماران تظاهراتی با شدت بیش‌تری همچون اختلال عملکرد قلبی، کبدی، کلیوی و ریوی مانند آریتمی و سندرم زجر حاد تنفسی و در نهایت مرگ مشاهده شده است(11-3). تشخیص قطعی کووید، براساس Real Time PCR با استفاده از سواپ نازوفارنکس و اوروفانکس می‌باشد(12). مهم‌ترین تظاهرات رادیولوژیک در CT scan، تغییرات ریوی از نمای ground-glass به consolidation گزارش شده(13،6) و مهم‌ترین شواهد آزمایشگاهی شامل لنفوسیتوپنی و افزایش CRP و ESR است(۱۵،۱۴). تاکنون تعداد بیماران مبتلا به کووید19، ۶۲۹،۹۷۸،۲۸۹ و تعداد مرگ و میر ۶،۵۸۲،۰۲۳ و تعداد دوز واکسن (4 دسامبر 2022) ۱۲،۹۹۸،۹۷۴،۸۷۸ توسط سازمان جهانی بهداشت اعلام شده است و با افزایش تعداد واکسن زده ها، همچنان در بسیاری از کشورها میزان مبتلایان جدید به کووید19 قابل توجه است(17،16). از طرفی با توجه به نبودن درمان قطعی بیماران مبتلا به کووید، سیستم ایمنی به عنوان خط اول درمان، نقش مهمی ایفا می‌کند(۱۹،۱۸،۱۱). در مطالعات اخیر نشان داده شده است که ابتلا به کووید19 می‌تواند منجر به افزایش پاسخ بیش از حد سیستم ایمنی که با طوفان سایتوکاینی شناخته می‌شود، گردد. طوفان سایتوکاینی یک پاسخ کشنده سیستم ایمنی با افزایش فعالیت سیستم ایمنی و تولید و ترشح سایتوکاین التهابی و مدیاتورهای شیمیایی است که می‌تواند منجر به نارسایی چند ارگانی شود(21،20،5). الگوی تحریک سیستم ایمنی با القای قابل توجهی از کموکاین‌های پیش التهابی متعدد همچون اینترلوکین‌های 6، 8، 10، 12، اینترفرون گاما همراه بوده است(22). یکی از سیتوکاین‌های افزایش یافته در بیماران مبتلا به کووید19، اینترلوکین 6 می‌باشد(21). اینترلوکین 6 سایتوکاینی با ساختار گلیکوپروتئین است که توسط سلول‌های متعددی همچون لنفوسیت T، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها، مونوسیت‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولی نوع II ، تولید و ترشح می‌شود(۲۴،۲۳،۲۱). ویروس با اتصال به سلول‌های اپی‌تلیالی ریه، سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را فعال کرده و منجر به ترشح واسطه‌های شیمیایی و سایتوکاین‌های التهابی از جمله اینترلوکین 6 می‌شود، در نتیجه با افزایش نفوذپذیری عروق ریوی و ورود حجم زیادی از مایع و سلول‌های خونی به آلوئول‌ها، باعث ایجاد تنگی نفس و نارسایی تنفسی می‌شود(18)؛ از طرفی اینترلوکین 6 با فعال کردن مسیر JAK/STAT3، باعث تنظیم کردن بیان ژن‌های متعددی همچون دیگر سیتوکاین‌ها و رسپتور و پروتئین کیناز ها می شود(25). این توانایی اینترلوکین 6 در ایجاد طوفان سایتوکاینی و افزایش نفوذپذیری عروق ریوی می‌تواند توجیه‌کننده ایجاد سندرم زجر تنفسی و ترومبوز عروق ریوی در بیماران کووید باشد(26). بر اساس دیگر مطالعات یکی دیگر از فاکتورهای موثر در درگیری ریوی بیماران مبتلا به کووید، اینترلوکین 8 می‌باشد(27). اینترلوکین 8 توسط سلول‌های متعددی همچون سلول لکوسیتی و غیرلکوسیتی (سلول‌های اپی‌تلیال و فیبروبلاست‌ها) تولید می‌شود. اینترلوکین 8 می‌تواند در التهاب، کموتاکسی، دگرانولاسیون نوتروفیل، فعال شدن لکوسیت‌ها و نقش موثری داشته باشد(28). افزایش غلظت اینترلوکین 8 در فرایند عفونت ریوی، منجر به فراخوانی نوتروفیل به سلول‌های اپی تلیالی ریوی شده که این افزایش تحریک و فعالیت نوتروفیل منجر به آزادسازی دیگر سیتوکاین‌های پیش التهابی و پروتئاز می‌شود و منجر به آسیب بیش‌تر و تخریب سلول‌های ریوی می‌شود. افزایش غلظت اینترلوکین 8 در مایع لاواژ برونکو آلوئولار می‌تواند با سندرم زجر حاد تنفسی در ارتباط باشد(30-28). بررسی عوامل مختلف موثر بر بهبود یا بدتر شدن بیماری کووید19 (ازجمله داروها) در کنار واکسیناسیون کامل افراد در سراسر جهان می‌تواند نقش بسیار مهمی در کنترل پاندمی و کاهش

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

تعداد مرگ و میر داشته باشد. مطالعات متعددی افزایش سطح اینترلوکین 6 را در بیماران کووید19 بستری در بیمارستان و ارتباط آن با شدت بیماری و مرگ و میر نشان داده‌اند. مطالعات اندکی نیز، پیشنهاداتی برای اندازه‌گیری سطح اینترلوکین 8 ارائه داده‌اند(23،33-31). با توجه به تناقضاتی که نتایج مطالعات مختلف از ارتباط بین سطح اینترلوکین6 و اینترلوکین8 در پیش‌بینی عاقبت بیماری کووید19 نشان داده‌اند و با در نظر گرفتن اهمیت سیستم ایمنی در مقابله با ویروس کووید19، این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای سطح اینترلوکین6 و اینترلوکین 8 در پیش‌بینی شدت و پیش‌آگهی در بیماران کووید19 پرداخته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی آینده‌نگر در سال 1400 در بیمارستان آموزشی رازی قائم شهر که مرکز ریفرال بیماری‌های عفونی می‌باشد، انجام پذیرفت. در این مطالعه سطح سرمی اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 در بیماران به روش ELISA سنجش شد. معیار ورود به مطالعه سن بالای 18 سال مبتلا به کووید19 بستری در بیمارستان بود که عفونت قطعی بیماران با تشخیص قطعی کووید-19 براساس معیارآزمایشگاهی تست مثبت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ترانس کریپتاز معکوس (Real Time-PCR) سواب نازوفارنکس انجام شد. معیار خروج شامل مواردی بود که پزشک معالج تشخیص دهد مرگ بیمار در مدت 24 ساعت قریب الوقوع و اجتناب‌ناپذیر است و یا در صورت داشتن سل فعال یا عفونت باکتریای، قارچی یا ویروسی غیر از SARS-CoV-2، بود. محاسبه حجم نمونه بر اساس فرمول کوکران براساس مطالعه رستمیان و همکاران(26) و توان 0/8 و سطح اطمینان 0/95 بود که تعداد بیمار برای بررسی حاضر 74 نفر محاسبه شد. گروه شاهد شامل کارکنان شاغل در بیمارستان رازی بودند. مراقبت استاندارد مطابق با تعاریف شدت کووید19براساس دستورالعمل مدیریت بالینی کووید19 سازمان بهداشت جهانی بود: 1- مرحله خفیف (بیماران قطعی کووید19 بدون شواهدی از پنومونی ویروسی یا هیپوکسی)، 2- بیماری متوسط (علائم بالینی پنومونی شامل تب، سرفه، تنگی نفس، تنفس سریع، اما بدون علائم پنومونی شدید، از جمله SpO2≥90 درصد در هوای اتاق بدون نیاز به اکسیژن مکمل)، 3- مرحله شدید (با علائم بالینی پنومونی شامل تب، سرفه، تنگی نفس، تنفس سریع به اضافه یکی از موارد تعداد تنفس >30 نفس در دقیقه، دیسترس تنفسی شدید، یا SpO2<90 درصد در هوای اتاق، 4- بحرانی (سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS)، سپسیس/شوک سپتیک، ترومبوز حاد) یا سایر شرایطی که به‌طور معمول به ارائه درمان‌های پایدار مانند تهویه مکانیکی (تهاجمی یا غیرتهاجمی) یا درمان با وازوپرسور نیاز دارند. مقوله‌های بحرانی نیز در مطالعه ما به عنوان "شدید" تعریف شدند(34).

دستورالعمل‌های منطقه‌ای (درمان ضد ویروسی، گلوکوکورتیکوئیدهای با دوز کم، مراقبت‌های حمایتی و..) برای همه بیماران انجام شد. رضایت کتبی آگاهانه از همه بیماران گرفته می‌شود یا اگر رضایت کتبی ارائه نشود، نماینده قانونی مجاز بیمار می‌تواند رضایت شفاهی را با مستندات مناسب ارائه شده توسط محقق بدهد. کلیه خصوصیات آزمایشگاهی بیماران شامل شمارش کامل سلول‌های خونی، پروفایل بیوشیمیایی و انعقادی هم‌چنین CRP و ESR برای همه بیماران درخواست شد. به منظور سنجش سطح سایتوکاین نمونه خون از افراد مورد مطالعه اخذ شد. نمونه سرم بیماران و گروه شاهد جمع‌آوری گردید و و با روش الایزا با استفاده از کیت در دسترس (KPG ایران) انجام شد. بر اساس کیت مورد استفاده، رنج نرمال برای اینترلوکین 6 و 8، 3-20 پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. هم‌چنین علایم بالینی تا زمان بهبودی یا مرگ روزانه ثبت و در نهایت داده‌های مطالعه با کمک نرم‌افزار آماری SPSS version 25، محاسبه آماره‌های تعداد و درصد توزیع فراوانی، میانگین و انحراف معیار و اجرای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

آزمون‌های t-test و Fisher exact test، chi square و one-way ANOVA انجام شد. لازم به ذکر است P value کم‌تر از 0/05به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. این پژوهش مورد تایید کمیته دانشگاهی اخلاق در پژوهش با کد IR.MAZUMS.REC.1400.10418) بود.

یافته ها

در مجموع 76 نفر وارد مطالعه شدند، که 51 نفر (گروه مورد)، مبتلا به کووید-19 تایید شده توسط آزمایش Real Time PCR بودند و 25 نفر افراد سالم با Real Time PCR کووید منفی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. میانگین سنی گروه مورد 46/86±13/03 سال (حداقل26 سال و حداکثر78 سال) بود که 60/8 درصد از آن‌ها مرد بودند. میانگین سنی گروه کنترل 44±8/43 سال (حداقل 29 سال و حداکثر 63 سال) بود که 60 درصد از آن‌ها مرد بودند.

31/4 درصد از افراد گروه مورد حداقل مبتلا به یکی از بیماری‌های دیابت، فشارخون و بیماری ایسکمیک قلبی بودند که شایع‌ترین بیماری زمینه‌ای، دیابت (25/5 درصد) بود. شایع‌ترین تظاهر بالینی در بیماران به‌ترتیب سرفه (72/5 درصد)، تنگی نفس (58/8 درصد) و علائم گوارشی(29/4 درصد) بود و میانگین Spo_2 اولیه در آن‌ها 91/1±5/88 درصد (حداقل 77 وحداکثر 97 درصد) مشاهده شد.

براساس گایدلاین سازمان جهانی بهداشت(WHO) بیماران در دو گروه فرم متوسط کووید19 (52/9 درصد) و فرم شدید کووید19 (47/1 درصد) طبقه بندی شدند. رنج نرمال غلظت سرمی اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8، 3-20 پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود که سطح سرمی اینترلوکین 8 در 62/7 درصد از افراد گروه مورد بیش تر از رنج نرمال مشاهده شد. هم‌چنین سطح سرمی اینترلوکین 6 در 49 درصد از افراد گروه مورد بیش‌تر از رنج نرمال بوده است. متوسط میزان اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 در گروه بیماران و در گروه شاهد در جدول شماره 1 آورده شده است. که از لحاظ آماری تفاوت بین گروه‌ها معنی‌دار بود به‌طوری‌که میانگین سطح اینترلوکین 6 در گروه بیماران حدود 4 بربر گروه شاهد و میانگین سطح اینترلوکین 8 در گروه بیماران حدوود 6 برابر گروه شاهد بوده است.

براساس آنالیز آماری One-way ANOVA متوسط میزان اینترلوکین 6 (P=0/004) و اینترلوکین 8 (P<0/001) در بیماران مبتلا به فرم شدید کووید19 در قیاس با فرم متوسط کووید19 و گروه شاهد بیش‌تر بوده است که به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: متوسط میزان اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 در گروه بیماران و در گروه شاهد

سایتوکاین ها در دو گروه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	سطح معنی داری	Confidence Interval of the Difference 95% حداقل	Confidence Interval of the Difference 95% حداکثر
اینترلوکین 6 گروه بیماران گروه شاهد	51	40/963	49/7084	0/0001<	9/454	49/351
	25	11/560	6/0785			
اینترلوکین 8 گروه بیماران گروه شاهد	51	30/080	25/3621	0/0001<	14/185	35/231
	25	5/372	10/1355			

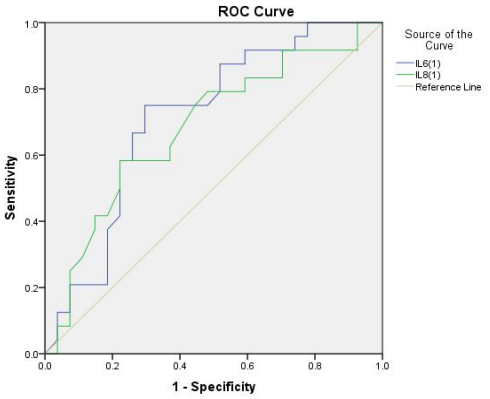
جدول شماره 2: سطوح اینترلوکین 6 و 8 در گروه های شدید، متوسط کووید-19 و گروه کنترل

سایتوکاین ها	گروه کنترل تعداد = 25 انحراف معیار ± میانگین	فرم متوسط کووید 19 تعداد = 27 انحراف معیار ± میانگین	فرم شدید کووید 19 تعداد =24 انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
اینترلوکین 6	6/07 ± 11/56 (Min - Max : 3-21)	46/08 ± 31/81 (Min - Max : 2-200)	52/55 ± 51/25 (Min - Max : 8/8-200)	0/004
اینترلوکین 8	10/13 ± 5/37 (Min - Max : 1-49)	23/62 ± 24/98 (Min - Max : 2-119)	26/507 ± 35/81 (Min - Max : 3/3-112)	<0/001

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

اختلاف متوسط مقدار اینترلوکین 6 در میان گروه شاهد و مبتلایان به فرم شدید کووید معنادار بوده درحالی که برای میانگین سطح اینترلوکین 8 این ارتباط معنادار میان گروه شاهد و مبتلایان به کووید مشاهده شد.

هم‌چنین ترسیم ROC Curve اینترلوکین‌های 6 و 8 در ارتباط با شدت بیماری نشان داد که این دو پارامتر برای پیش‌بینی ابتلا به فرم شدید کووید19 قابل استفاده و کارآمد هستند (P_{IL-8}=0/026، P_{IL-6}=0/008)، (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: نمودار ROC CURVE اینترلوکین‌های 6 و 8 در ارتباط با شدت بیماری کووید 19

بین سطح اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 و فاکتورهای دموگرافیک شامل سن، جنس و بیماری‌های زمینه‌ای مذکور به جهت آماری ارتباط معنی‌داری یافت نشد. در میانگین پارامترهای آزمایشگاهی اندازه گیری شده در مبتلایان به فرم متوسط و شدید کووید تفاوت وجود دارد که به لحاظ آماری تنها میان مقدار CRP و شدت بیماری ارتباط معنی‌دار یافت شد (P=0/009)، جدول شماره 3. به طور کلی از میان افراد گروه مورد، 4 بیمار (7/8 درصد) مبتلا به فرم شدید کووید در ICU بستری شده و فوت شدند. میانگین مقدار اینترلوکین 6 (P_{IL-6}=0/347) و اینترلوکین 8 (P_{IL-8}=0/62) در بین افراد مبتلا به فرم شدید کووید که ترخیص و فوت شدند، متفاوت بوده که از نظر آماری معنی‌دار نبود.

جدول شماره 3: نتایج آزمایشات در افراد با فرم شدید و متوسط کووید19

پارامترهای آزمایشگاهی	فرم متوسط کووید19 تعداد = 24 انحراف معیار ± میانگین	فرم شدید کووید19 تعداد = 27 انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
WBC (×10⁹/L)	5/151 ±1/561	4/904 ±2/15	0/843
Lymph (×10⁹/L)	1/085 ±0/440	0/791 ±0/271	0/207
PLT (×10⁹/L)	179/933 ±53/708	152/478 ±80/356	0/515
BS (mg/dL)	123/44 ±48/64	165/5 ±121/3	0/245
Urea (mg/dL)	28/15 ±6/1	36/21 ±12/26	0/324
Creatinine (µmol/L)	0/859 ±0/198	0/962 ±0/274	0/775
AST (U/L)	34/81 ±12/56	100/62 ±178/63	0/254
ALT (U/L)	30/07 ±15/14	93/5 ±174/81	0//448
ALP (IU/L)	142/22 ±36/79	194/5 ±119/31	562
LDH (U/L)	559/11 ±245/1	934/33 ±347/69	0/434
CPK	212/52 ±160/22	369/21 ±235/51	0/302
ESR	30/85 ±19/007	52/08 ±21/98	0/155
CRP (mg/L)	2 ±1/27	3/04 ±0/69	0/009
D-Dimer	791/81 ±720/304	968/04 ±496/96	0/393

بین میزان مورتالیتی بیماران و فاکتورهای دموگرافیک شامل سن، جنس و بیماری‌های زمینه‌ای مذکور ارتباط معنی‌داری یافت نشد. میانگین طول بستری بیماران در بیمارستان 6/65±3/03 روز (حداقل 4 روز و حداکثر 15روز) بود. طول بستری و فاکتور های دموگرافیک شامل سن و جنس به جهت آماری ارتباط معنی‌داری نداشتند؛ در حالی که بین بیماری‌های زمینه‌ای مذکور و مدت بستری ارتباط معنی‌دار یافت شد(P=0/01).

از نظر آماری ارتباطی میان مدت بستری در بیمارستان و سطح اینترلوکین 6 (P_{IL-6} =0/1) مشاهده نشد، در صورتی‌که بین مدت زمان بستری و مقدار اینترلوکین 8 (P_{IL-8}=0/012) این ارتباط وجود داشت. متوسط میزان درگیری ریه در CT Scan مبتلایان به کووید -19، 48/92±18/42درصد (حداقل20 و حداکثر 80 درصد) بوده است. میان میزان درگیری ریوی بیماران با سطح اینترلوکین 6، اینترلوکین 8، ESR و CRP ارتباط آماری یافت نشد.

بحث

سایتوکاین‌ها،گلیکوپروتئین هایی هستند که مسئول کنترل فرایندهای التهابی و تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌باشند(35). سایتوکاین‌ها اثر دوگانه‌ای در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

مواجهه با بیماری‌های عفونی دارند، به طوری که نقش کلیدی در کنترل ویروس و جلوگیری از گسترده شدن عفونت در بدن را ایفا می‌کنند، از سوی دیگر تولید کنترل نشده آن‌ها منجر به سندرم آزادسازی سایتوکاین‌ها (CRS) می‌شود که بیماران را به سمت سندرم زجر حاد تنفسی و مرگ می‌برد(36). بدین ترتیب شناخت سایتوکاین‌ها و تغییرات آن‌ها طی دوره بیماری می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش‌بینی کننده در طراحی الگوریتم‌های درمانی کووید19 کمک‌کننده باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده نقش موثر اینترلوکین‌های 6 و 8 در شدت بیماری کووید19 برخلاف پروگنوز آن می‌باشد. اینترلوکین 6 در بسیاری از سلول‌ها مانند لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها در پاسخ به استرس‌های مختلف مانند تروما و سوختگی و عفونت‌ها تولید می‌شود(37) و موجب رشد و تمایز لنفوسیت‌ها و ترشح پروتئین‌های مختلف مانند CRP از کبد می‌شود(33). اینترلوکین 8 با اثر تحریکی بر روی نوتروفیل‌ها و خاصیت ضدباکتریال به واسطه تولید شکل‌های فعال اکسیژن به عنوان یک واسطه التهابی در CRS شرکت می‌کند(38). در راستای نتایج مطالعه حال حاضر، بسیاری از محققین نشان دادن داده‌اند که سطح سرمی بالای اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 با شدت بیماری کووید19 ارتباط دارد(6،31،41-39)، اما این‌که کدام یک از این دو سایتوکاین نقش پروگنوز بهتری خواهد داشت نیاز به بررسی‌های گسترده‌تری دارد. در مطالعه‌ای که McElvaney و همکارانش انجام دادند، دریافتند بیماران کوویدی که در ICU بستری بودند به‌صورت معنی‌داری اینترلوکین‌های 6 و 8 بیش‌تری نسبت به بیماران کوویدی که در شرایط متعادل بوده‌اند، داشتند(42). برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر، قاضوی و همکارانش در مطالعه‌ای که بر روی پروفایل سایتوکاین و شدت بیماری کووید19 انجام دادند مشاهده کردند که سطح اینترلوکین 8 در بین مبتلایان به فرم شدید و فرم خفیف تفاوت چشمگیری ندارد، هرچند در بین گروه بیماران خفیف و افراد سالم تفاوت قابل ملاحظه‌ای در سطح سرمی اینترلوکین 8 دیده‌اند(43).

در اکثر مطالعاتی که بر روی عفونت با SARS-CoV2 انجام شده است بر این مورد تاکید شده است که اینترلوکین 6 و 8 با ARDS و پروگنوز ضعیف ارتباط دارد(40،46-44) و این امر با یافته مطالعه حال حاضر مطابقت ندارد که می‌تواند به دلیل حجم نمونه کم مطالعه حاضر و بازه سنی بیماران فوت شده بوده باشد(47).

یافتن بیومارکرهایی که پیش‌بینی‌کننده طول مدت بستری بیماران در بیمارستان‌ها باشد از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه حال حاضر نشان داده شده است که سطح سرمی بالای اینترلوکین 8 برخلاف اینترلوکین 6 با افزایش طول مدت بستری بیماران مبتلا به کووید در بیمارستان ارتباط دارد. در مطالعه ما بین سطح سرمی اینترلوکین 6 و 8 و فاکتورهای دموگرافیک ارتباطی دیده نشد که برخلاف یافته‌های ما، Xu و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به فرم شدید کووید19، ارتباط معنی‌داری بین سن و سطح سرمی اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 و سطح CRP یافتند(48).

در مطالعات قبلی نشان داده شده است که عفونت با SARS-CoV2 موجب کاهش تعداد لنفوسیت‌ها می‌شود که این یافته در بیماران مبتلا به فرم شدید بیماری برجسته‌تر بوده است و این یافته می‌تواند در ارتباط با افزایش بیان ژن TP53 در بدن آن‌ها و القای آپوپتوز در لنفوسیت‌های این بیماران باشد(40،49). برخی دیگر از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش اینترلوکین 6 و اینترلوکین 8 علاوه بر کاهش تعداد لنفوسیت‌ها با اختلال عملکرد آن ها نیز مرتبط می‌باشد که می‌تواند ناشی از اختلال در سایتوتوکسیسیته سلول‌های ایمنی باشد(34،50،51). اگرچه در مطالعه ما نیز همراستا با مطالعات قبلی تعداد لنفوسیت‌ها در فرم شدید بیماری در مقایسه با فرم خفیف تا شدید کاهش یافته بود، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

CRP یکی از پروتئین‌های التهابی می‌باشد که تولید آن در کبد تحت تاثیر اینترلوکین 6 می‌باشد. اکثر مطالعات قبلی حاکی از ارتباط بین افزایش CRP سرم و شدت و پروگنوز بیماری کووید19 بوده است(52،49،48،46،32) اما در تعدادی از مطالعات دیگر نشان داده شده است که سطوح بالای CRP در فرم شدید بیماری کووید19 مربوط به بیماری‌های زمینه‌ای و مزمن بیماران می‌باشد و ارتباطی با شدت عفونت با SARS-CoV2 ندارد(49). بر اساس مطالعه ما بیماران مبتلا به فرم شدید کووید19 در مقایسه با فرم متوسط سطوح بالاتر CRP را دارند، بنابراین می‌توان از CRP به عنوان یک بیومارکر پیش‌بینی‌کننده شدت بیماری استفاده کرد.

اکثر مطالعات قبلی نشان دهنده ارتباط سطوح بالای LDH سرم و شدت بیماری و پروگنوز ضعیف بیماری کووید19 بوده‌اند(41) و این یافته‌ها می‌تواند با ارتباط LDH و آسیب‌های بافتی و مولتی ارگان توصیف شود(53). در مطالعه حال حاضر سطح سرمی LDH در بیماران مبتلا به فرم شدید در مقایسه با متوسط افزایش یافته بوده اما به لحاظ آماری این ارتباط معنی‌دار نبوده است.

مطالعات قبلی که بر روی افراد آلوده شده به SARS-CoV2 انجام شد، نشان داده است که برخی فاکتورهای دموگرافیک (مانند سن، جنس مرد و سیگاری بودن) با پروگنوز ضعیف بیماری کووید19 ار تباط دارند(41) که با یافته‌های حاصل از مطالعه ما همخوانی ندارد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به حجم نمونه کم و عدم آنالیز همبستگی بین اینترلوکین 6 و 8 و سایر بیومارکرهای زیستی اشاره کرد، که توصیه می‌شود در آینده مطالعات بیش‌تری با حجم نمونه‌های بیش‌تر و آنالیزهای آماری گسترده‌تری انجام گیرد. در نهایت مطالعه حاضر نشان داده است که سطوح سرمی اینترلوکین6 و اینترلوکین 8 در بیماران مبتلا به کووید19 می‌تواند در پیشبینی شدت بیماری و پیش‌آگهی کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت تصویب این پروژه (کد طرح: 10418)نهایت تشکر و سپاسگزاری را داریم. این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی بیماری‌های عفونی و گرمسیری دکتر سحر آزاده می‌باشد.

References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 2020; 382(8): 727-733.
2. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak-an update on the status. Mil Med Res 2020; 7(1): 11.
3. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. Nature 2020; 583(7816): 459-468.
4. Sykes DL, Holdsworth L, Jawad N, Gunasekera P, Morice AH, Crooks MG. Post-COVID-19 Symptom Burden: What is Long-COVID and How Should We Manage It? Lung 2021; 199(2): 113-119.
5. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. J Med Virol 2021; 93(1): 250-256.
6. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020; 395(10223): 497-506
7. Alian S, Pakzad A, Ahangarkani F, Godazandeh F, Majidi H, Darzi P, et al. Chest CT Scan

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

Findings and Severity of Disease in Patients with COVID-19 Admitted to Qaemshahr Razi Hospital 2020-2021. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32(208): 84-93 (Persian).

8. Babamahmoodi F, Ahangarkani F, Alikhani A, Hatami M, Delavaryan L, Emadi S, et al. Comparing Clinical and Para-clinical Findings and Risk Factors among COVID-19 Survived and Deceased Patients in North of Iran, 2019-2020. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(201): 70-82 (Persian).
9. Babamahmoodi F, Najafi N, Davoudi A, Ahangarkani F, Majidi H, Delavarian L. Zero case of COVID-19: Where? When? And who? Pneumonia consistent with COVID-19 in iran before the first confirmed case of the disease in the world: A case report. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(195): 112-117 (Persian).
10. Najafi N, Bakhshi P, Alizadeh-Navaei R, Ahangarkani F, Akbari Z, Mirzakhani M, et al. Clinical Epidemiology of Deceased COVID-19 Patients in Mazandaran Heart Center, 2020-2021. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32(207): 79-89 (Persian).
11. Rezai MS, Ahangarkani F, Hill A, Ellis L, Mirchandani M, Davoudi A, et al. Non-effectiveness of ivermectin on inpatients and outpatients with COVID-19; results of two randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trials. Front Med 2022; 9: 919708.
12. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. JAMA 2020; 323(15): 1502-1503.
13. Feng Y, Ling Y, Bai T, Xie Y ,Huang J, Li J, et al. COVID-19 with Different Severities: A Multicenter Study of Clinical Features. Am J Respir Crit Care Med 2020; 201(11): 1380-1388.
14. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med 2003; 348(20): 1986-1994.
15. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med 2003; 348(20): 1977-1985.
16. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. Available from: https://www.who.int. Accessed December 4, 2022.
17. Babamahmoodi F, Saeedi M, Alizadeh-Navaei R, Hedayatizadeh-Omran A, Mousavi SA, Ovaise G, et al. Side effects and Immunogenicity following administration of the Sputnik V COVID-19 vaccine in health care workers in Iran. Sci Rep 2021; 11(1): 21464.
18. Zhang L, Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. J Med Virol 2020; 92(5): 479-490.
19. Babamahmoodi F, Rezai MS, Ahangarkani F, Mohammadi Kali A, Alizadeh-Navaei R, Alishahi A, et al. Multiple Candida strains causing oral infection in COVID-19 patients under corticosteroids and antibiotic therapy: An observational study. Front Cell Infect Microbiol 2022; 12: 1103226.
20. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the `Cytokine Storm' in COVID-19. J Infect 2020; 80(6): 607-613.
21. Grifoni E, Valoriani A, Cei F, Lamanna R, Gelli AMG, Ciambotti B, et al. Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19. J Infect 2020; 81(3): 452-482.
22. Wong CK, Lam CW, Wu AK, Ip WK, Lee NL, Chan IH, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

respiratory syndrome. Clin Exp Immunol 2004; 136(1): 95-103.

23. Rossi J-F, Lu Z-Y, Jourdan M, Klein B. Interleukin-6 as a Therapeutic Target. Clin Cancer Res 2015; 21(6): 1248-1257.
24. Narazaki M, Kishimoto T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. Int J Mol Sci 2018; 19(11): 3528.
25. Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL, Borca MV. The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. Front Microbiol 2019; 10: 1057.
26. Rostamian A, Ghazanfari T, Arabkheradmand J, Edalatifard M, Ghaffarpour S, Salehi MR, et al. Interleukin-6 as a Potential Predictor of COVID-19 Disease Severity in Hospitalized Patients and its Association with Clinical Laboratory Routine Tests. Immunoregulation 2020; 3(1): 29-36.
27. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. Clinical Infect Dis 2020; 71(15): 762-768.
28. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol 2003; 284(4): L566-L77.
29. Reeves EP, Williamson M, O'Neill SJ, Greally P, McElvaney NG. Nebulized hypertonic saline decreases IL-8 in sputum of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183(11): 1517-1523.
30. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clinical Invest 1989; 84(4): 1045-1049.
31. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. J Allergy Clin Immunol 2020; 146(1): 128-136.
32. Kesmez Can F, Özkurt Z, Öztürk N, Sezen S. Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL 10 levels on the severity in COVID 19 infection. Int J Clin Prac 2021; 75(12): e14970.
33. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014; 6(10): a016295.
34. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet 2020; 395(10223): 507-513.
35. Bartee E, McFadden G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. Cytokine 2013; 63(3): 237-240.
36. Darif D, Hammi I, Kihel A, El Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? Microb Pathog 2021; 153: 104799.
37. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. Nat Rev Immunol 2018; 18(12): 773-789.
38. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. Front Biosci 2008; 13: 2400-2407.
39. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. Clin Infect Dis 2020; 71(8): 1937-1942.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

40. Huang W, Li M, Luo G, Wu X, Su B, Zhao L, et al. The Inflammatory Factors Associated with Disease Severity to Predict COVID-19 Progression. J Immunol 2021; 206(7): 1597-1608.
41. Izcovich A, Ragusa MA, Tortosa F, Lavena Marzio MA, Agnoletti C, Bengolea A, et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. PloS One 2020; 15(11): e0241955.
42. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. Am J Respir Crit Care Med 2020; 202(6): 812-821.
43. Ghazavi A, Ganji A, Keshavarzian N, Rabiemajd S, Mosayebi G. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. Cytokine 2021; 137: 155323.
44. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. Nat Med 2020; 26(10): 1636-1643.
45. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. Int J Mol Sci 2019; 20(23): 6008.
46. Liu T, Zhang J, Yang Y, Ma H, Li Z, Zhang J, et al. The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. EMBO Mol Med 2020; 12(7): e12421.
47. Patterson BK, Guevara-Coto J, Yogendra R , Francisco EB, Long E, Pise A, et al. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning. Front Immunol 2021; 12: 700782.
48. Xu X, Yu MQ, Shen Q, Wang LZ, Yan RD, Zhang MY, et al. Analysis of inflammatory parameters and disease severity for 88 hospitalized COVID-19 patients in Wuhan, China. Int J Med Sci 2020; 17(13): 2052-2062.
49. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect 2020; 9(1): 761-770.
50. Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, Notari S, Grassi G, Tartaglia E, et al. An Inflammatory Profile Correlates With Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. Clin Infect Dis 2020; 71(16): 2272-2275.
51. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, Capone M, Vanni A, Spinicci M, et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. J Clin Invest 2020; 130(9): 4694-٤703.
52. Karakoyun I, Colak A, Turken M, Altin Z, Arslan FD, Iyilikci V, et al. Diagnostic utility of C-reactive protein to albumin ratio as an early warning sign in hospitalized severe COVID-19 patients. Int Immunopharmacol 2021; 91: 107285.
53. Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. Clin Chem Lab Med 2020; 58(7): 1021-1028.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]