

ارزیابی bcl-2 و Bax در داکتال کارسینومای مهاجم پستان و ارتباط با رستپورهای

استروئیدی و مارکر پروليفراسيون سلولي توسط روش ايمونوهيستوشيمي

دکتر نوریه شریفی^۱، دکتر کامران غفارزاده گان^۲، دکتر محمدجواد فرهنگند^۳، دکتر مجتبی طلابی خوئی^۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان شایعترین تومور بدخیم و در راس علل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان میباشد. آپوپتوزیس نقشی اساسی در چرخه سلولی سلولهای طبیعی و تومورال ایفا می کند. آپوپتوزیس توسط گروهی از پروتئین ها شامل Bax و bcl-2 کنترل می شود. در این مطالعه بروز پروتئین های Bax و bcl-2 در ۴۶ بیمار مبتلا به سرطان مجرای مهاجم پستان و ارتباط با بروز ki-67 و گیرنده های استروژن و پروژسترون می پردازیم.

مواد و روشها: برشهای بافتی ثابت شده در فرمالین ۴۶ بیمار مبتلا به سرطان مجرای پستان توسط روش ايمونوهيستوشيمي مورد بررسی قرار گرفت. سپس تجزیه و تحلیل های آماری برای بررسی ارتباط معیار های بالینی و آسیب شناختی با بروز Bax، bcl-2، ki-67، ER و PR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: چهل و شش بیمار مبتلا به سرطان مجرای پستان با میانگین سنی چهل و پنج سال مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به سیستم بلوم-ریچاردسون ۸٫۷٪ درجه ۱، ۸۰٪ درجه ۲ و ۱۱٪ درجه ۳ بودند. ۸۷٪ بیماران به بیش از چهار گره لنفوی متاستاز داشتند. با توجه به نتایج ايمونوهيستوشيمي، ۴۳٪ bcl-2 مثبت، ۴۱٪ ER مثبت و ۳۹٪ PR مثبت و ۹۵٪ Bax مثبت داشتند. میانگین اندکس ki-67 ۴۰٪ بود. ارتباط معنی داری بین بروز Bax، ER، PR و نیز سائز تومور موجود بود. هیچ ارتباطی بین Bax با ER و PR وجود نداشت. ارتباط معنی داری از نظر آماری بین اندکس ki-67 با ER و PR و درجه و متاستاز به گره لنفوی وجود داشت. همچنین ارتباط معنی دار آماری بین ER و PR و اندازه تومور و درجه و متاستاز به گره های لنفی وجود داشت.

نتیجه گیری: bcl-2 بعنوان فاکتور مهار کننده آپوپتوز در مکانیسم بروز سرطان پستان نقش ایفا میکند و میتواند واسطه ای در عملکرد ER و PR باشد و یا اینکه نقشی مستقل را ایفا نماید. Ki-67 بعنوان مارکر تکثیر سلولی هیچ ارتباطی با فاکتورهای آپوپتوز ندارد اما در ارتباط با ER و PR و گرید و وضعیت گره های لنفی می تواند در پیش آگهی بیماران اثر داشته باشد. بخاطر درصد بالای مثبت شدن Bax بنظر ما ايمونوهيستوشيمي راه مناسبی برای ارزیابی Bax نیست و بهتر است از روشهای مولکولی برای ارزیابی آن استفاده شود.

کلمات کلیدی: آپوپتوزیس، پستان، کارسینوم مهاجم مجرای

مقدمه

آپوپتوز نقش اساسی در چرخه سلولی و زیست شناسی سرطانی ایفا می کند و توسط خانواده ای از پروتئین ها کنترل می گردد. در این خانواده پروتئین bcl-2 و Bax نقشی اساسی در تنظیم آپوپتوزیس ایفا می نمایند (۱).

این فاکتورها اولین بار توسط آنالیز کروموزمی لنفوم فولیکولار

شناسائی گردیدند (۲) KI-67 مارکر شناخته شده تزاید سلولی در بسیاری از تومورها می باشد. ER، PR، هورمونهای استروئیدی می باشند که تزاید و تمایز سلولی را در سرطان پستان کنترل و تنظیم می کنند. محصولات ژنی این مارکرها میتوکندریال هستند و توسط ايمونوهيستوشيمي ارزیابی می گردند (۳).

۱- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه آسیب شناسی، مرکز آموزشی-درمانی قائم

۲- دستیار تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه آسیب شناسی، مرکز آموزشی-درمانی قائم (نویسنده مسئول)

۳- دکترای حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد، دانشکده پزشکی، مرکز آموزشی-درمانی قائم

یافته ها

۴۶ نمونه از سرطان مجرانی مهاجم پستان مورد ارزیابی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفته و نتایج با یافته های کلینکوپاتولوژیک با استفاده از تستهای آماری مناسب مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- نتایج کلینکوپاتولوژیک ۴۶ مورد بلوکهای پارافینی

متغیر	تعداد	درصد
سن		
۲۰-۴۰ سال	۱۲	۲۶
۴۰-۵۰ سال	۲۲	۴۸
۵۰-۷۰ سال	۱۲	۲۶
وضعیت گره های لنفاوی		
منفی	۲	۴/۴
کمتر و یا مساوی ۳ گره	۴	۸/۸
بیشتر از ۳ گره	۴۰	۸۶/۸
درجه		
۱	۴	۸/۷
۲	۳۷	۸۰/۴
۳	۵	۱۰/۹

از ۴۶ بیمار مورد مطالعه ۲۰ مورد (۴۳٪) از نظر bcl-2 مثبت و ۲۶ مورد (۵۷٪) منفی بودند. ۲۷ بیمار (۵۹٪) از نظر ER منفی و ۱۹ بیمار (۴۱٪) از نظر ER مثبت بودند. ۲۸ بیمار (۶۱٪) از نظر PR منفی و ۱۸ بیمار (۳۹٪) از نظر PR مثبت بودند. ۲ بیمار (۴/۴٪) از نظر Bax منفی بودند و ۴۴ (۹۵/۶٪) از نظر Bax مثبت بودند. اندکس KI67 از یک تا ۹۰٪ با میانگین ۴۰٪ بود (نمودار ۱).

ارتباط مستقیم آماری بین بروز bcl-2 و مثبت شدن گیرنده های استروژن و پروژسترون ($P < 0/05$) و همچنین بین bcl-2 و اندازه تومور ($P < 0/05$) وجود داشت اما ارتباطی بین bcl-2 با KI-67 و سن و گرید تومور و متاستاز به غدد لنفاوی وجود نداشت ($P > 0/05$). ارتباطی بین Bax با PR ($P > 0/05$) و ER ($P > 0/05$) وجود نداشت اما ارتباط معنی دار آماری بین اندکس KI-67 با ER ($P < 0/05$) و PR ($P < 0/05$) و همچنین بین اندکس KI-67 با گرید ($P < 0/05$) و متاستاز به غده لنفی ($P < 0/05$) وجود داشت. ارتباط معنی دار آماری بین

هدف این مطالعه ارزیابی ایمونوهیستوشیمی بروز فاکتورهای آپوپتوتیک (Bax, bcl-2)، گیرنده های استروئیدی و KI67 و ارتباط آن با رفتار سرطان پستان توسط روش ایمونوهیستوشیمی می باشد.

مواد و روش ها

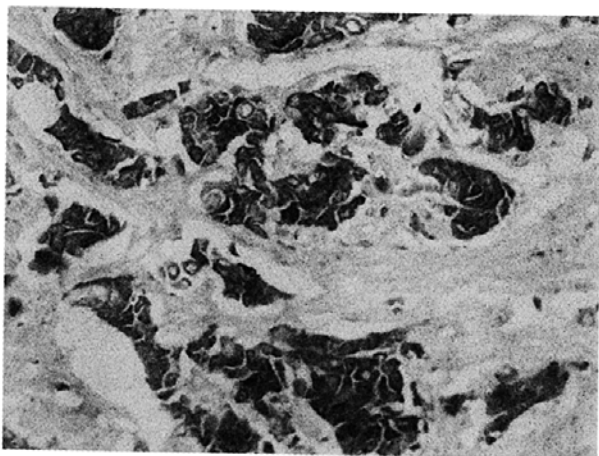
برای انجام مطالعه از ۴۶ بلوک پارافینی سرطان مجرای مهاجم پستان که در بایگانی گروه آسیب شناسی بیمارستان قائم مشهد بوده استفاده گردید. نمونه ها برش داده شده و لامها با H&E رنگ آمیزی گردید و تمامی تشخیص ها توسط ۲ آسیب شناس و با توجه به سیستم درجه بندی بلوم ریچاردسون طبقه بندی شد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی توسط سیستم استرپتواویدین بیوتین پراکسیداز انجام گردید. بدین صورت که برش چهار میکرونی از هر نمونه بلوک پارافینی انجام شد و سپس در گزین و پارافینه گردید و توسط محلول های الکل با درصد مختلف هیدراتاسیون مجدد گردید و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی توسط روش target انجام گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- آنتی بادیهای اولیه مورد استفاده در این مطالعه

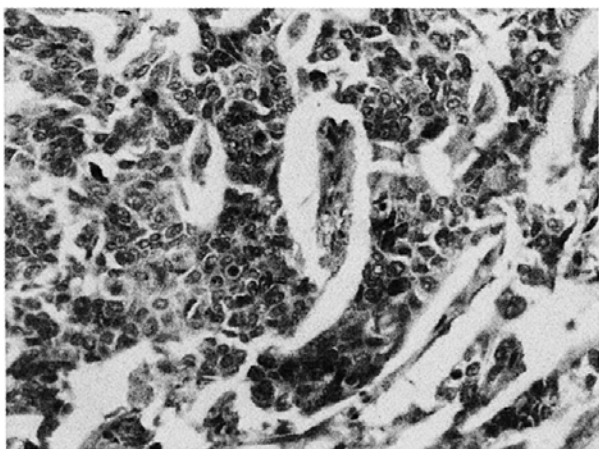
KI-67	PR	ER	Bax	bcl-2	ANTIGEN SOURCE
DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO
MIB1	PGR ۶۳۶	ID5	Ab-1	۱۲۴	CLONE
Mouse monoclonal	Mouse monoclonal	Mouse monoclonal	Rabbit polyclonal	Mouse monoclonal	TYPE
Target for 45 min	Target for 45 min	Target for 45 min	Target for 45 min	Target for 45 min	PRETREATMENT
N1633	N1630	N1575	A3533	N1587	CODE
Ready to use	Ready to use	Ready to use	۱/۲۰	Ready to use	DILUTION
Tonsil	Known pos. breast can.	Known pos. breast can.	Colon	Tonsil	POSITIVE CONTROL

دو آسیب شناس الگوی رنگ آمیزی را بررسی و براساس کیفیت و میزان رنگ آمیزی درجات ضعیف (+)، متوسط (++) و شدید (+++) و همچنین درصد سلول های مثبت را در مطالعه تعیین کردند.

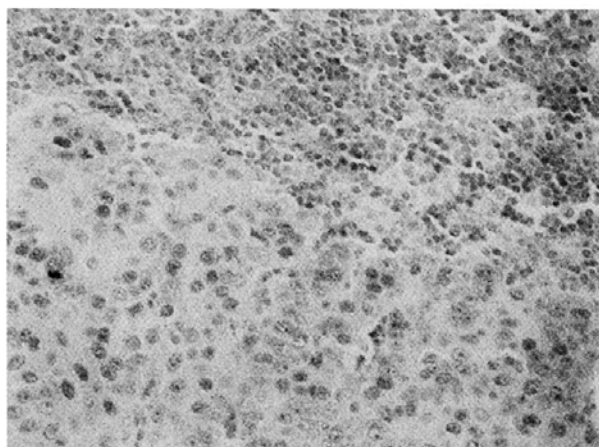
آماري بين PR با اندازه تومور و گريد و تهاجم به غده لنفي ($P < 0/05$) موجود بود ولي با سن ارتباط نداشت ($P > 0/05$) (شکل ۱-۵)



شکل ۱- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی bcl-2 در کارسینوم مهاجم مجرانی پستان (بزرگنمایی ۴۰۰)



شکل ۲- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bax در کارسینوم مهاجم مجرانی پستان (بزرگنمایی ۴۰۰)



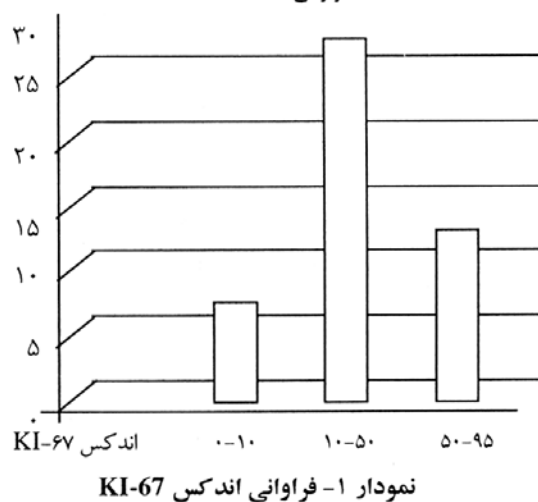
شکل ۳- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ER در کارسینوم مهاجم مجرانی پستان (بزرگنمایی ۴۰۰)

Bax با سائز تومور و گريد تومور و سن و متاستاز به غدد لنفي و همچنين با درصد بروز bcl-2 وجود نداشت

جدول ۳- خلاصه نتایج رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

مارکو	تعداد (درصد)
Bcl-2	
منفی	۲۶ (۵۶,۵)
مثبت ضعیف	۹ (۱۹,۵)
مثبت متوسط	۱۰ (۲۱,۸)
مثبت قوی	۱ (۲,۲)
Bax	
منفی	۲ (۴,۴)
مثبت ضعیف	۲۸ (۶۰,۸)
مثبت متوسط	۱۵ (۳۲,۶)
مثبت قوی	۱ (۲,۲)
ER	
منفی	۲۷ (۵۸)
مثبت ضعیف	۸ (۱۷)
مثبت متوسط	۱۱ (۲۳)
مثبت قوی	۰ (۰)
PR	
منفی	۲۸ (۶۱)
مثبت ضعیف	۷ (۱۵)
مثبت متوسط	۹ (۱۹,۶)
مثبت قوی	۲ (۴,۴)

فراوانی



نمودار ۱- فراوانی اندکس KI-67

ارتباط معنی دار آماری بين درصد بروز ER با اندازه تومور و گريد و تهاجم به غدد لنفوي همگي ($P < 0/05$) وجود داشت اما ارتباطی با سن ($P > 0/05$) وجود نداشت. همچنین ارتباط

(MIB1, KI67) و فاکتورهای آپوتوتیک نیز از عوامل موثر

بر پروگنوز در بسیاری از مطالعات می باشند (۵).

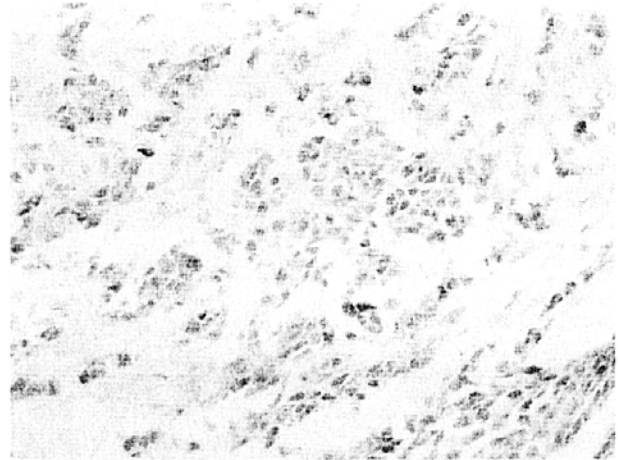
در سالهای اخیر استفاده از روشهای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی کمک شایانی به بررسی این فاکتورها در سرطان پستان نموده است.

آپوتوز یک روند سلولی برنامه ریزی شده می باشد که منجر به تخریب سلول منفرد در بافت سلولی می گردد (۶-۸). این امر می تواند محرک های مختلفی همچون رادیاسیون، داروها، سموم یا توسط کاهش عوامل هورمونی و فاکتورهای رشد سلولی ایجاد گردد (۹ و ۱۰).

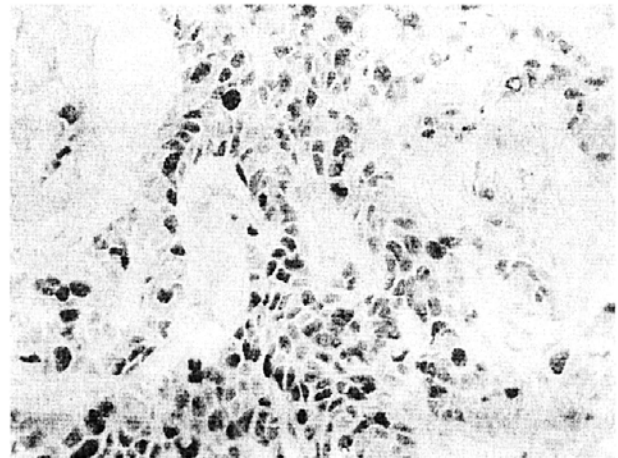
روند آپوتوز توسط ژنهای مختلفی مشتمل بر: فعال کننده ها (Bak, Bax, bcl-x, P53) و مهار کننده ها (mcl-1, bcl-2) (۱۱). تعادل بین این پروتئین ها توسط عوامل دیگری همچون گیرنده های هورمونی استروژنی و پروژسترونی در کانسر پستان تنظیم می گردد (۱۲). بروز بیش از حد bcl-2 با مهار آپوتوز باعث افزایش بقاء سلول می گردد در حالی که افزایش بروز Bax باعث تسریع در مرگ سلولی می شود (۱۳ و ۱۴). با این حال نقش bcl2 در سرطان مجرائی پستان بنظر می رسد که بیش از این پیچیده باشد (۱۵). در حالی که سرطان های پستان سطوح بالایی از bcl2 را بروز می دهند با این حال آنها میزان تکثیر سلولی پائین و درجه هیستوپاتولوژیک پائین و پروگنوز بهتری را نشان می دهند (۱۵).

ارتباط قوی آماری بین بروز bcl-2 و وضعیت گیرنده های ER, PR وجود دارد، که هر دو این ریسپتورهای هورمونی با پروگنوز مناسب همراه هستند (۱۵). ER-β در میتوکندری قرار دارد و دلالت بر این دارد که بطور مستقیم در برخی از اعمال میتوکندری دخالت دارد (۱۵). جالب توجه است که bcl-2 نیز در غشاء داخلی میتوکندری و همچنین در غشاء هسته و در رتیкулوم اندوپلاسمیک نیز بروز می کند (۱۵ و ۱۶).

ارتباط مستقیم آماری بدست آمده در این تحقیق بین بروز bcl-2 و گیرنده های هورمونی دلالت بر تأثیر متقابل فاکتورهای آپوتوز و گیرنده های استروئیدی در کانسر پستان دارد و همراه با پاسخ خوب به درمان های هورمونی می باشد. در مطالعه ای که آقای سیزیوپیکو و همکاران انجام دادند ارتباط مستقیم



شکل ۴- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی PR در کارسینوم مهاجم مجرائی پستان (بزرگنمایی ۴۰۰)



شکل ۵- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی KI-67 در کارسینوم مهاجم مجرائی پستان (بزرگنمایی ۴۰۰)

بحث و نتیجه گیری

سرطان پستان فراوان ترین تومور بدخیم در زنان می باشد که رفتار بیولوژیک قابل توجه دارد. همه متفق القول می باشند که عوامل مولکولار و بیولوژیک متعددی بر پیش آگهی سرطان پستان در بیماران مبتلا موثر است که این عوامل شامل محتوای DNA به میزان تکثیر سلولی (KI-67)، آپتوز (Bax, bcl2)، انکوژن ها، فاکتورهای آنژیوژنز و وضعیت ریسپتورهای هورمونی استروئیدی (ER, PR) می باشند (۳). نویسندگان مختلف با توجه به مطالعات انجام داده بر روی این فاکتورها نظرات متفاوتی را در مورد عوامل موثر بر پیش آگهی سرطان پستان ابراز داشته اند. در مورد گیرنده های هورمونی ارتباط قوی آماری بین درصد بروز آنها در سرطان پستان و پاسخ به هورمون درمانی وجود دارد (۴). عوامل تکثیر سلولی

است روش ایمونوهیستوشیمی، روش مناسبی برای ارزیابی Bax در سرطان پستان نباشد (۱۹). مطالعات مشابه انجام شده توسط Lin jawi و همکارانش (۲۰) و با سارووا و همکارانش (۲۱) بر ارتباط مهم بروز bcl-2 با رسیپتورهای هورمونی استروئیدی تأکید نمودند.

در نهایت ارزیابی فاکتورهای پیش آگهی پستان از نظر بررسی سیر و روند درمان بیماران بسیار ارزشمند می باشد و با توجه به نقش این عوامل در روند درمان بایستی با انجام مطالعات بیشتر و استفاده از روشهای مولکولی جدید به کشف ارتباط پیچیده مولکولی ایجاد کننده و پیش برنده سرطان پستان همت گماشت. هزینه این مطالعه توسط معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد تامین شده است. در نهایت از کمک های آزمایشگاه دکتر موید کمال تشکر را دارا می باشیم.

References

- 1-Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax -alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J CANCER*. 1995;60:854-9.
- 2-Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985; 1440.
- 3-Jarvinen T, Pelto-huikko M, Holli K. Estrogen receptor B Is co expressed with ER-alfa and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol*. 2000; 156:29-35.
- 4- Silverberg SJ, Delellis DA, Fralde WJ. Surgical pathology and cytology. 4th Edition, Churchill Livingstone. 2006; P: 486-9.
- 5- Silverberg SJ, Delellis DA, Fralde WJ. Surgical pathology and cytology. 4th Edition, Churchill Livingstone. 2006; P: 486-9.
- 6-Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death *Cell Biol* , 1994;124:1-6.
- 7-Hockenber DM. Bcl-2 in cancer development and apoptosis. *J Cell Sci*. 1994;18:51-5.
- 8-Kerr JF, winter ford CM, Harmon BV: Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* .1994; 73:2013-26.

آماری بین بروز مارکر Her/2 با ژن bcl-x1 وجود داشت اما ارتباطی بین Her/2 با bcl-2 مشاهده نگردید. و نتیجه گیری نمودند که اجزاء مختلف پروتئین های خانواده bcl-2 عملکرد آپوپتوتیک مختلفی در سرطان پستان دارند و برعکس bcl-2 که همراه با پروگنوز ضعیف در سرطان پستان نمی باشد bcl-2 از فاکتورهای تضعیف کننده پیش آگهی سرطان پستان می باشد (۱۷و۱۸). در مطالعه ما نیز ارتباط آماری بین PR,ER با اندازه و درجه و تهاجم به گره های لنفاوی وجود داشت؛ به این معنی که بیماران با رسیپتورهای هورمونی لنفاوی اندازه تومور بزرگتر و درجه بافتی بالاتر و میزان بالاتری از درگیری غدد لنفاوی داشتند. با این حال بروز Bax در مطالعه ما هیچ ارتباط معنی دار آماری با PR,ER و وضعیت درگیری گره های لنفاوی نداشت. در مطالعات مختلف دیگر انجام شده نیز وضعیت بروز گیرنده Bax در سرطان مجرای پستان پیچیده است و ممکن

- 9-Yang E, Korsmeyer SK. Molecular thanatopsis : A discourse on the BCL-2 family and cell death *Blood* . 1996; 88:386-401.
- 10-Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and the treatment of disease. *Science* .1995; 267:1456-62.
- 11-Craig RW. The bcl-2 gene family. *Semin cancer Biol* .1995;6:35-43.
- 12-Broise LH, Gottschalk AR, Quinfans J, Tompson CB: Bcl-2and bcl-2 related proteins in apoptotic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;200:107-121.
- 13-Oltavi ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserval homolog, Bax that accelerates programmed cell death. Structure – function analysis of protein. *Cell* .1993; 74:609-19.
- 14-Hanada M, Aime-sempe C, Sato T, ET AL. Identification of conserved domains important for homodiverzation with Bcl-2 and heterodiverzation with Bax. *J Biol Chem* .1995; 270:11962-9.
- 15- Mishawaka Y, Tamaru N, Ejima K. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer: its inhibitory role in the induction of apoptosis possibly through the over expression of bcl-2. *Arch Histol Cytol*. 2004; 67:455-64.
- 16-Linjawi A, Kontogiannea M, Halwani F, Edward M. Prognostic significance of P53, BCL-

2, and BAX expression in early breast cancer. J Am Coll Surg. 2004; 198:83-90.

17-Tamaru N, Ejima K, Hishikawa Y, Inoue S. Estrogen receptor -associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer. Laboratory Investigation. 2004;84:1460-71.

18-Siziopikou KP, Khan S. Correlation of HER/2 gene amplification with expression of the apoptosis- suppressing genes BCL-2 and BCL-XL in ductal carcinoma of breast. Appl Immunohistochem Mol Mrophol .2005; 13(1): 14-8.

19-Rehman S, Crow J, Peter A. BAX protein expression in DCIS of breast in relation to invasive ductal carcinoma and other molecular markers; Patho Oncol Res. 2000;6:256-63.

20-Linjawi A, Kontagionnea M, Halwani F. Prognostic significance of P53 ,BCL-2 , and BAX expression in early breast cancer. J Am Coll Surg. 2004; 198(1):83-90.

21-Bassarova AV ,Nesland JM, Sedlove T. Simultaneous bilateral breast carcinomas: A category with frequent co expression of HER/2 and ER-alfa ,high KI-67 and BCL-2,and low P53. Int J Surg Path.

Evaluation of bcl-2 and Bax in Invasive-Ductal breast carcinoma and its correlation with steroidal receptors and cellular proliferative markers using Immunohistochemistry

Sharifi N; MD¹, Ghafarzadeghan K; MD¹, *Farahmand MJ; MD², Talaei-Khoei M; MD³

Abstract

Background: Breast carcinoma has been regarded as the most common malignant tumors and the leading cause of death due to cancer in women. Apoptosis plays a central role in both normal cell cycle and tumor biology; it is controlled by family of related proteins including Bax and bcl-2. This study was designed to evaluate the expression of Bax and bcl-2 proteins in 46 cases of Invasive-Ductal carcinoma of breast and their correlation to the expression of ki-67, estrogen and progesterone receptors immunohistochemically.

Materials and methods: Formalin fixed paraffin embedded-tissue from 46 cases of invasive ductal carcinoma of breast were analyzed by immunohistochemistry (IHC) method. We performed a statistical analysis to investigate the relationship between clinicopathological parameters and Bax, bcl-2, KI-67, ER, PR expressions.

Results: Forty-six cases of invasive ductal carcinoma of breast with mean age 45 were studied. According to Bloom-Richardson score system of 46 cases, 8.7% were grade 1, 80% were grade 2 and 11% were grade 3. Eighty-seven percent of cases had 4 or more lymph node metastasis. According to IHC results, 43% were bcl-2 positive, 28% were ER positive, 39% were PR positive, and 95% were Bax positive, mean KI-67 index was 40%. There was significant correlation between bcl-2 expression and ER, PR and size of tumor. There wasn't any correlation between Bax and PR and ER status. There was statistically correlation between KI-67 index and ER and PR status, grade and metastasis to lymph nodes. There was statically correlation between ER and PR status and size of tumor, grade and metastasis to lymph nodes.

Conclusion: Bcl-2, as an anti-apoptotic factor, plays an important role in biology of breast cancer. It may be a mediator in the action of ER and PR or it may have independent role. KI-67 as a proliferative maker, doesn't have any correlation with apoptotic factors, but have prognostic value through its relation to ER, PR, grade and LN status. Because of high rate of Bax positively, we guess IHC isn't a good way for evaluation of Bax and it is better to use molecular methods.

Keywords: Apoptosis, Breast, Ductal carcinoma, Invasive, Immunohistochemistry, Steroidal receptors

- 1- Assistant professor, Mashhad University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Ghaem Medical Center
- 2- (*Corresponding author) Resident, Mashhad University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Ghaem Medical Center
- 3- General physician, Mashhad University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Ghaem Medical Center