مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال بیست و هشتم/شماره ۱۱۸/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۸۹
تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۸ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۱۰/۱۰

بررسی میزان همراهی پروتئین P16 با دیسپلازی سرویکس در کرمانشاه

دکتر بابک ایزدی[۱]، صدیقه خزاعی[۲]، دکتر سید قاسم میربهاری[۳]

خلاصه

مقدمه: سرطان گردن رحم دومین سرطان شایع در زنان می‌باشد. کشف زودرس آن به وسیله‌ی تست پاپ اسمیر باعث کاهش مرگ و میر ناشی از این سرطان شده است. با این حال این تست دارای موارد منفی و مثبت کاذب نیز می‌باشد. به تازگی پروتئینی به نام P16 که یک مهار کننده‌ی کیناز وابسته به سیکلین (CDKI یا Cyclin-dependent Kinase) می‌باشد، شناسایی شده است. این پروتئین در کانسر سرویکس بروز بیش از حد (Ove-erxpression) پیدا می‌کند و مطالعه به ارتباط مارکر P16 با دیسپلازی دهانه‌ی رحم پرداخته‌ایم.

روش‌ها: در این مطالعه از ۴۵ بیمار با تشخیص دیسپلازی نمونه گیری مجدد به عمل آمد. نمونه‌های گرفته شده با اسپاچولا، در محلول Liquid-base ریخته شد. پس از آماده سازی نمونه‌ها، از هر نمونه ۲ لام تهیه و یکی با رنگ پاپ نیکولائو و دیگری به روش ایمنوسیتوشیمی با مارکر P16 رنگ آمیزی شد. نتایج بررسی لام‌های رنگ آمیزی شده با برنامه‌ی SPSS نسخه‌ی ۱۵ و با آزمون آماری t-test مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از بررسی لام‌های رنگ آمیزی شده با پاپ نیکولائو نتایج پاتولوژی به صورت ۱۳ مورد (۲۹ درصد) ASCUS، ۱۸ مورد (۴۰ درصد) LSIL، ۱۱مورد (۲۴ درصد) HSIL و ۳ مورد (۷ درصد) S.C.C بود. در بررسی ایمنوسیتوشیمی برای مارکر P16 نتایج (۱۰۰٪، ۳/۳) S.C.C، (۱۰۰٪، ۱۱/۱۱) HSIL، (۶۷٪، ۱۲/۱۸) LSIL، (۲۳٪، ۳/۱۳) ASCUS به دست آمد. افزایش درصد مثبت شدن مارکر P16 ارتباط معنی‌داری با افزایش درجه‌ی دیسپلازی در نمونه‌های پاپ اسمیر نشان داد ($P < ۰/۰۰۰۱$ به روش t-test).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه افزایش درصد مثبت شدن مارکر P16 ارتباط معنی‌داری با افزایش درجه‌ی دیسپلازی در نمونه‌های پاپ اسمیر نشان داد؛ به همین دلیل پیشنهاد می‌شود از تست P16 به عنوان یک تست Optional (همراه) برای کشف دیسپلازی سرویکس استفاده شود.

واژگان کلیدی: پاپ اسمیر، دیسپلازی سرویکس، پروتئین P16.

مقدمه

کانسر سرویکس یکی از مهم‌ترین بدخیمی‌های زنان (۱) و شایع‌ترین بدخیمی سیستم تناسلی خانم‌ها در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود (۲). چند دهه‌ی پیش، شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان، در بسیاری از کشورهای غربی بوده است ولی با استفاده‌ی گسترده از (Pap-smear) سیتولوژی در غربالگری خانم‌ها، به طور موفقیت آمیزی کاهش در بروز کارسینوم مهاجم و کاهش شدید در مرگ ناشی از این کانسر ایجاد شده است (۴-۳). تقریباً تمام کارسینوم‌های مهاجم سرویکس یک مرحله از رشد سلول‌های غیر طبیعی که محدود به اپی‌تلیوم می‌باشد (Intraepithelial Stage) را طی می‌کنند. تفاوت‌های مرفولوژیک بین مراحل مقدماتی کانسر سرویکس قابل کشف است (۵-۲) و این امکان را می‌دهد که از طریق سیتولوژی این مراحل را از همدیگر افتراق دهیم. بین مراحل پیش سرطانی، دیسپلازی و کارسینوم سرویکس فاصله‌ی زمانی مناسبی وجود دارد؛ به طوری که حتی

[۱] استادیار،گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
[۳] پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بابک ایزدی
bizadi@hotmail.com Email:

www.mui.ac.ir

در ضایعات درجه‌ی بالای (High grade) دیسپلازی فاصله‌ی زمانی تا تبدیل شدن به کانسر مهاجم چندین ماه تا چندین سال طول می‌کشد (۷-۶). این مدت زمان ارزش ویژه‌ای به اقدامات غربال‌گری و کشف ضایعات پیش سرطانی می‌دهد.

پروتئین RB، یک کلید خاموش و روشن برای چرخه‌ی سلولی و تقسیم سلولی می‌باشد. با فسفریله شدن پروتئین RB، سد اصلی برای جلوگیری از رشد چرخه‌ی سلولی از بین می‌رود و باعث پیشرفت تکثیر سلولی می‌گردد (۹-۸، ۴-۲).

مجموعه عوامل پروتئینی که باعث فسفریله شدن RB می‌شود، تحت کنترل مهارکننده‌های سلولی هستند؛ از جمله این مهار کننده‌ها INK4/ARF است که به عنوان سرکوب کننده‌ی تومور عمل می‌کند و به طور شایعی در تومورها دچار تغییر می‌شود. INK4/ARF انسانی کد کننده‌ی دو پروتئین P16INK4a و P14ARF است که چرخه‌ی سلولی را مهار می‌کند و به صورت Tumor Suppresor عمل می‌نماید (۱۰، ۴-۳).

این پروتئین (P16INK4a) در بسیاری ازکانسرهای انسانی جهش می‌یابد و یا به وسیله‌ی موتاسیون غیر فعال می‌گردد (۴-۳). مطالعات اخیر در مورد بعضی نئوپلاسم‌ها از جمله کانسر سرویکس نشان می‌دهد که غیر فعال شدن RB با بروز بیش از حد P16INK4a همراه می‌باشد (۱۱، ۳).

به تازگی مطالعاتی صورت گرفته است تا ارتباط این پروتئین را در نمونه‌های هیستولوژی و سیتولوژی ضایعات پیش نئوپلاستیک نشان دهند و از این مارکر به عنوان نشانه‌ای از دیسپلازی و تغییر نئوپلاستیک استفاده نمایند. شاید این مارکر بتواند مشکل موارد مشکوک دیسپلازی و نئوپلاستیک را حل نماید که هدف اصلی این مطالعه نیز می‌باشد.

روش‌ها

در این مطالعه، بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های پاتوبیولوژی پارس و رازی کرمانشاه که نتیجه‌ی آزمایش پاپ اسمیر آن‌ها آسکوس، دیسپلازی و یا کارسینوم بود (S.C.C، HSIL، LSIL، ASCUS، AGUS یا آدنوکارسینوم)، پس از کسب اجازه از بیمار دوباره نمونه گیری شد. نمونه‌های گرفته شده از بیماران را در محلول Liquid-base ریخته، تا زمان تهیه‌ی لام در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از فرایند آماده سازی روی محلول‌های Liquid-base، نمونه‌های سلول بیماران را بر روی لام چسب دار (شارژ شده با Poly-L-Lysine) برای رنگ آمیزی ICC و یک لام معمولی برای رنگ آمیزی پاپ نیکولائو قرار دادیم.

رنگ‌آمیزی ICC (Immunocytochemistry): در مرحله‌ی بازیابی آنتی‌ژن از EpitopeRetrivalSolution (DAKO.K5340) از پیش گرم شده در دستگاه بخارپز و در دمای ۹۰-۸۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد و نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه‌ی DAKO.k5340: Mouse Anti-Human P16INK4a Protein به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه و در مرحله‌ی آنتی بادی ثانویه با محلول DAKO.K5340: Visualization Reagent به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، در شرایط تاریکی و رطوبت انکوبه شد. پس از آن از محلول Substrate-Chromogen Solution (DAB) به مدت ۱۰ دقیقه بر روی نمونه‌ها ریخته و از رنگ هماتوکسیلین به عنوان زمینه استفاده شد. نتایج به دست

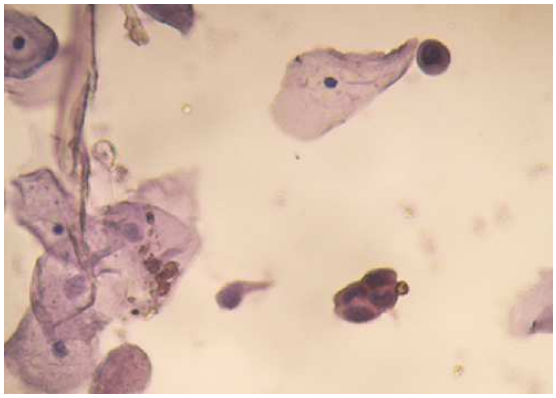
www.mui.ac.ir

آمده از رنگ آمیزی ICC برای مارکر P16 با آزمون آماری t-test در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز شد.

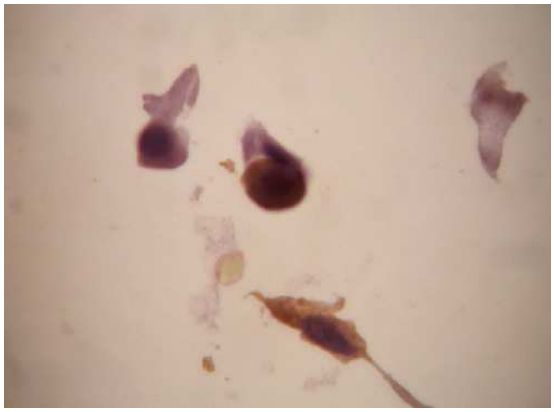
یافته‌ها

سن متوسط افراد مورد مطالعه ۱۲ ± ۴۲ (دامنه‌ی سنی ۷۰-۱۶ سال) بود. از این تعداد ۴۱ نفر (۹۱ درصد) متأهل و ۴ نفر (۹ درصد) مطلقه بودند. نتایج رنگ آمیزی لام‌ها که با Pap Stain رنگ شده بود توسط پاتولوژیست تحت بازبینی قرار گرفت و ۱۳ مورد (۲۹ درصد) ASCUS، ۱۸ مورد (۴۰ درصد) LSIL، ۱۱ مورد (۲۴ درصد) HSIL و ۳ مورد (۷ درصد) S.C.C نشان داد. در نمونه‌ها هیچ موردی از AGUS یا آدنوکارسینوم گزارش نشد.

در بررسی نتایج رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی مارکر P16INK4a، چنانچه ۱۰ سلول دیسپلاستیک رنگ پذیری سیتوپلاسمیک و هسته‌ای داشتند، نمونه برای مارکر P16 مثبت در نظر گرفته شد (Cut-off). شکل‌های ۱-۲ نمونه‌های موارد مثبت در این مطالعه می‌باشند.



شکل ۱. نمونه‌ی HSIL با رنگ آمیزی ICC برای مارکر P16



شکل ۲. نمونه‌ی SCC با رنگ آمیزی ICC برای مارکر P16

جدول ۱. نتایج بررسی رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی (**ICC**) برای مارکر **P16**

تشخیص سیتولوژی بر روی نمونه‌های Liquid-base توسط گروه تحقیق	نتایج ICC مثبت	نتایج ICC منفی	مجموع (درصد)
ASCUS	۳ (٪۲۳)	۱۰ (٪۷۷)	۱۳ (٪۱۰۰)
LSIL	۱۲ (٪۶۷)	۶ (٪۳۳)	۱۸ (٪۱۰۰)
HSIL	۱۱ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۱۱ (٪۱۰۰)
S.C.C	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰)	۳ (٪۱۰۰)
مجموع (درصد)	۲۹ (٪۶۴)	۱۶ (٪۳۶)	۴۵ (٪۱۰۰)

www.mui.ac.ir

در کل ۲۹ (۶۴ درصد) مورد از بیماران از نظر P16 مثبت و ۱۶ (۳۶ درصد) مورد منفی بودند. هر ۳ مورد S.C.C در رنگ آمیزی P16 به شدت (۱۰۰ درصد) مثبت بودند. از ۱۱ مورد HSIL هر ۱۱ مورد ICC (۱۰۰ درصد) مثبت بودند، ولی از ۱۸ مورد LSIL، ۱۲ مورد (۶۷ درصد) مثبت و ۶ مورد (۳۳ درصد) منفی و از ۱۳ مورد ASCUS تنها ۳ مورد (۲۳ درصد) مثبت و ۱۰ مورد (۷۷ درصد) منفی بود. با افزایش درجه‌ی دیسپلازی در نمونه‌های سیتولوژی درصد مثبت بودن برای مارکر P16 بالاتر می‌رود و این یافته از نظر آماری نیز معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۰۰۱$ به روش t-test).

بحث

همان طور که در مقدمه نیز ذکر شد تفاوت‌های گزارش پاتولوژی در بین پاتولوژیست‌ها (Interobserver) و حتی یک پاتولوژیست در زمان‌های مختلف (Intraobserver) در نمونه‌های سیتولوژی و هیستولوژی سرویکس محققان را بر آن داشته است تا این مشکل را بر طرف نمایند. پیدا کردن انکو پروتئین ناشی از آلودگی به HPVهای خطرناک تاکنون بی‌نتیجه بوده است، اما یک مارکر ایمنوسیتوشیمی به نام P16 INK4a مورد توجه واقع شده است که ارتباط غیر مستقیم با آلودگی با انواع خطرناک HPVها را دارد. در این مطالعه وجود این مارکر را بر روی نمونه‌های سیتولوژی (پاپ اسمیر) به روش Liquid-base بررسی نمودیم چرا که Takaakisano و همکاران (۱۲)، Wiley-Liss (۱۳) و Gayer و همکاران (۱۴) این روش را به اندازه‌ی بررسی نمونه‌های هیستولوژی برای مارکر P16 با ارزش دانسته‌اند و حتی Takaakisano و همکاران (۱۲) و Wiley-Liss (۱۳) تمیز بودن زمینه و عدم نیاز به روش تهاجمی جراحی را از مزایای این روش ذکر نموده‌اند.

آنتی‌بادی مورد استفاده در مطالعه‌ی ما، آنتی‌بادی منوکلونال E6H4 بود که بر طبق مطالعه و بررسی‌های Bibbo و همکاران (۱۱) و Volgareva و همکار (۱۵) یکی از بهترین مارکرها برای سنجش P16 با بیشترین قدرت اتصالی به Ag مورد نظر و کمترین اتصال غیر اختصاصی بوده است. همان طور که مشاهده می‌شود با افزایش درجه‌ی دیسپلازی در نمونه‌های سیتولوژی (۲۳٪، ۳/۱۳) ASCUS، (۶۷٪، ۱۲/۱۸) LSIL، (۱۰۰٪، ۱۱/۱۱) HSIL، (۱۰۰٪، ۳/۳) S.C.C درصد مثبت بودن (احتمال مثبت شدن) برای مارکر P16 بالاتر می‌رود و این یافته از نظر آماری نیز معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۰۰۱$ به روش t-test)؛ این نتیجه را Bibbo و همکاران (۱۱)، Takaakisano و همکاران (۱۲) و Saqi و همکار (۱۶) به دست آورده‌اند. در مطالعه‌ی Volgareva و همکاران با این که درصد مثبت بودن برای مارکر P16 پایین بوده اما افزایش مثبت بودن برای مارکر P16 با افزایش درجه‌ی دیسپلازی کاملاً مشهود بوده است (LSIL: ۳۷٪، HSIL: ۶۷٪، S.C.C: ۹۶٪). در مطالعه‌ی اخیر به نظر خود نویسنده، استفاده از بلوک‌های پارافینی چند سال پیش و Cut-off بالا (در مطالعه‌ی آن‌ها Cut-off مثبت بودن بیش از ۲۵ درصد سلول‌های مورد نظر بوده است) را علت نتایج مثبت کم ذکر می‌کند (۱۵). ایشان در مقاله‌ی خود آنتی‌بادی منوکلونال E6H4 را نیز به جهت اتصال غیر اختصاصی کمتر به عنوان علتی برای پایین بودن درصد مثبت بودن مطرح نموده‌اند که با

www.mui.ac.ir

توجه به مطالعات Bibbo و همکاران (۱۱) و Takaakisano و همکاران (۱۲)، این مسأله منتفی می‌باشد.

در بعضی مطالعات مثل مطالعه‌ی Takaakisono و همکاران، رنگ پذیری منتشر و قوی برای این مارکر را در دیسپلازی‌های درجه‌ی بالا و کارسینوم مورد توجه قرار داده است که این مسأله در تمامی ۳ مورد S.C.C و اکثریت موارد HSIL مطالعه‌ی ما صادق بود (۱۲).

نکته‌ی دیگر، مثبت بودن تمام موارد HSIL (۱۰۰ درصد) و S.C.C (۱۰۰ درصد) از نظر P16 بود که در مطالعات Bibbo و همکاران (۱۱) و Saqi و همکار (۱۶) نتایج مشابهی را به دست آورده‌اند. در مطالعات دیگر نیز این درصد بسیار بالا بوده است و در یک بررسی که به مطالعه‌ی مقالات موجود در این رابطه پرداخته است، هیچ مطالعه‌ای درصد مثبت بودن این مارکر را در کارسینوم سرویکس کمتر از ۹۰ درصد گزارش نکرده است؛ حتی در مطالعه‌ی Volgoreva و همکار با این که درصد کلی مثبت بودن پایین بوده است، تنها ۳ درصد نتایج منفی را در کارسینوم سرویکس ذکر می‌کنند. این موضوع ارزش P16 را درکشف دیسپلازی‌های درجه‌ی بالا بیشتر نمایان می‌کند (۱۵).

اما در ارتباط با مواردی از ASCUS که مارکر P16 مثبت شده است (۲۳٪، ۳/۱۳)، به نظر می‌رسد که این‌ها مواردی از ASCUS هستند که احتمال بیشتری برای پیشرفت به سمت دیسپلازی‌های درجه‌ی بالاتر را دارند. این مسأله در گزارش استاندارد سیستم Bethesda نیز اشاره شده است و آن‌ها را تحت عنوان ASC-H بیان می‌کند (۱۷).

همین موضوع در مورد موارد منفی LSIL نیز صادق است. ما فکر می‌کنیم این‌ها همان موارد از LSILهای برگشت پذیر باشند (۷، ۴)؛ البته اثبات قطعی این موضوع نیاز به پی‌گیری بیماران در مطالعه‌ای دیگر دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از اعضای هیأت علمی، دستیاران گروه پاتولوژی و کلیه‌ی پرسنل آزمایشگاه پاتوبیولوژی رازی، پارس و بیمارستان امام رضا (ع) و اعضای مرکز تحقیقات مولکولار پاتولوژی تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مقاله حاصل بخشی از طرح و پایان‌نامه‌ی دانشجویی دستیاری پاتولوژی به شماره‌ی ۸۴۰۷۳ مصوب در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.

References

1. Konya J, Veress G, Hernadi Z, Soos G, Czegledy J, Gergely L. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias. J Med Virol 1995; 46(1): 1-6.
2. Rosai j. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2004.
3. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 8th ed. Philadelphia: WB. Saunders; 2007.
4. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. Philadelphia: WB. Saunders; 2005.
5. Johnson LD, Nickerson RJ, Easterday CL, Stuart RS, Hertig AT. Epidemiologic evidence for the spectrum of change from dysplasia through carcinoma in situ to invasive cancer. Cancer 1968; 22(5): 901-14.
6. Gray W. Diagnostic Cytopathology. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002.
7. Berek JS, Editor. Berek & Novak's Gynecology. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
8. Salehi R, Shafaee P. prevalence of HPV infection in cervical cancer samples. Journal of Urmia University of Medical Sciences, 2001; 12(1): 160.
9. Zhou XB, Guo M, Quan LP, Zhang W, Lu ZM,

www.mui.ac.ir

Wang QH, et al. Detection of human papillomavirus in Chinese esophageal squamous cell carcinoma and its adjacent normal epithelium. World J Gastroenterol 2003; 9(6): 1170-3.

10. Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997; 6(6): 387-400.

11. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. Acta Cytol 2002; 46(1): 25-9.

12. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998; 153(6): 1741-8.

13. Pietong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B. Immunocytochemical staining of p16ink4A protein from conventional pap test and its association with human-papillomavirus infection. Diagn Cytopathol 2004; 31: 235-42.

14. Geyer J, Marino J. Evaluation of Liquid-PrepTM Encapsulation Method for Liquid-Based Cytology Cell Loss Estimates during Processing. Proceedings of the 15th International Congress of Cytology. 2004 April 11–15; Santiago, Chile.

15. Volgareva G, Zavalish ina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. BMC Cancer 2004; 4: 58.

16. Saqi A, Pasha T. Overxpression of P16INK4a in liquid-base specimen (Sur path) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. Diagno Cytopathology 2002; 27(6): 365-70.

17. Kurman RJ, Solomon D, Luff R, Henson D. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses: Definitions, Criteria and Explanatory Notes for Terminology and Specimen Adequacy. Berlin: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co; 1994.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 28, No 118, 2nd week, February 2011 Received: 9.11.2010 Accepted: 31.12.2010

A Survey on Association of P16 Protein and Uterine Cervical Dysplasia

Babak Izadi MD[1], Sedigheh Khazaei MSc[2], Sayed Ghasem Mirbahari MD[3]

Abstract

Background: Cervical (uterine) carcinoma is the second most frequent type of women cancer. Success in early diagnosis of this disease is due to the use of pap-smear test. However, this test has both false-positive and false-negative results. P16 protein is a Cyclin-dependent Kinase inhibitor supposed to be overexpressed in cervical dysplasia and cancer. Our study was about correlation between P16 and cervical dysplasia.

Methods: In this study 45 patients with dysplastic abnormalities in cervix (including Ascus-H) were sampled for papsmear (by Liquid-base method). Two smears were stained, one with papanicolau and the other (by IHC) for P16. The results were compared using t-test via $SPSS_{15}$ software.

Finding: Pap-stain revealed 13 ASCUS (29%), 18 LSIL (40%), 11 HSIL (24%), and 3 S.C.C (7%). Immunostaining of P16 protein was observed in ASCUS (3/13, 23%), LSIL (12/18, 67%), HSIL (11/11, 100%), and S.C.C (3/3, 100%). P16 had significant correlation with degree of cervical dysplasia in Liquid-base pap-smear ($P < 0.0001$).

Conclusion: We suggest the usage of P16-test as an optional test for cervical dysplasia according to our study.

Keywords: Pap-Smear, Cervical dysplasia, Protein P16.

[1]Assistant Professor of Pathology, Molecular Pathology Research Center, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
[2] Molecular Pathology Research Center, Imam Reza Hospital, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
[3] Pathologist, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
Corresponding Author: Babak Izadi PhD, Email: bizadi@hotmail.com

www.mui.ac.ir