

بررسی بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Epstein-Barr Virus در گروهی از بیماران مبتلا

به کارسینوم پاپیلاری تیروئید در شهر اصفهان

مژگان مختاری^۱، منا بحرینی اصفهانی^۲، فائقه ناجی^۳، علی صفائی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینوم پاپیلاری، شایع‌ترین بدخیمی غده‌ی تیروئید است که خاصیت لنفوتروپیک قوی دارد و احتمال می‌رود ابتلا به Epstein-barr virus (EBV) در بروز آن نقش داشته باشد. مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Epstein-barr virus (EBNA یا Epstein-barr virus nuclear antigen) به عنوان عامل مؤثر احتمالی در کارسینوم پاپیلاری تیروئید در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۴ انجام شد.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر، بر روی ۴۳ نمونه‌ی کارسینوم پاپیلاری تیروئید تأیید شده توسط پاتولوژیست انجام شد. با استفاده از بلوک پارافینی بافت تثبیت شده در فرمالین، به روش Polymerase chain reaction (PCR) کیفی، بیان EBNA در بافت تومور بررسی شد. اطلاعات مربوط به سن، جنس، اندازه‌ی تومور و درگیری غدد لنفاوی از پرونده‌ی بیماران استخراج شد. در نهایت، اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های Fisher's exact، Mann-Whitney و Independent t در نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان EBNA در ۹ مورد (۲۰/۹ درصد) از نمونه‌ها شناسایی شد. بررسی رابطه‌ی بیان EBNA با عوامل مختلف نشان داد که بین سن افراد و بیان ژن ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P < 0/05$). در مقابل، دیگر عوامل مورد بررسی، رابطه‌ی معنی‌داری با بیان EBNA نداشتند ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به این که در حدود ۲۱ درصد از بیماران EBNA بیان شد، احتمال ارتباط بین بروز بیماری و بیان این ژن وجود دارد، اما برای بررسی دقیق‌تر این موضوع، پیشنهاد می‌شود در طراحی مطالعات دیگر، گروه شاهد نیز مد نظر باشد.

واژگان کلیدی: Epstein-barr virus، کارسینوم پاپیلاری تیروئید، Epstein-barr virus nuclear antigen

ارجاع: مختاری مژگان، بحرینی اصفهانی منا، ناجی فائقه، صفائی علی. بررسی بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Epstein-Barr Virus در گروهی از بیماران

مبتلا به کارسینوم پاپیلاری تیروئید در شهر اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۱۵): ۱۶۵۲-۱۶۴۸

تیروئید و پس از بررسی آسیب‌شناسی بافتی اتفاق می‌افتد. کارسینوم پاپیلاری تیروئید، در افراد دارای سابقه‌ی تماس تیروئید با اشعه‌ی ایکس و سابقه‌ی فامیلی مثبت از نظر ابتلا به سرطان تیروئید شایع‌تر است (۳). با این وجود، در بیشتر بیماران علت اصلی ابتلا به سرطان تیروئید مشخص نیست. عواملی مانند تماس با مواد کارسینوژن و ابتلا به برخی ویروس‌ها مانند Epstein-barr virus (EBV) ممکن است در ابتلا به بیماری نقش داشته باشند (۴).

EBV که با نام ویروس هرپس انسانی ۴ (HHV-4) یا Human herpes virus-4 نیز شناخته می‌شود، یک ویروس DNA

مقدمه

کارسینوم پاپیلاری، شایع‌ترین بدخیمی غده‌ی تیروئید است که به طور معمول در افراد ۴۰-۳۰ ساله دیده می‌شود و در زنان شایع‌تر است (۱). این کارسینوم، ماهیت لنفوتروپیک قوی دارد و موجب بیماری چند کانونی درون غده‌ی تیروئید می‌شود و تمایل به متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای دارد. پیش‌آگهی کارسینوم پاپیلاری تیروئید با درمان مناسب عالی است و بقای عمر ۱۰ ساله در بیش از ۹۰ درصد موارد دیده می‌شود (۲). تشخیص این تومور در بسیاری از موارد، به دنبال لوپکتومی تیروئید جهت درمان بیماری‌های خوش‌خیم و ندول‌های

۱- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- پزشک عمومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

EB1 5'-ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC, EB2 5'-ACTCAATGGTGTAAAGACGAC
 ۲۵۰ نانوگرم از DNA حاصل از نمونه‌های بافتی به مخلوط PCR شامل ۱۰ میلی‌مولار Tris (pH = ۸/۳)، ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم Ethylenediaminetetraacetic acid (KCl)، ۱۰ میلی‌مولار EDTA)، ۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱۰۰ میلی‌مولار Deadenosine triphosphate (dATP)، (dCTP)، (dGTP) و (dTTP)، ۰/۲ میلی‌مولار از هر پرایمر، ۰/۱ میلی‌مولار TaqMan fluorogenic probe و ۱/۲۵ واحد از آنزیم AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) اضافه شد و در نهایت، به دنبال فعال‌سازی آنزیم AmpliTaq Gold برای ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵۰-۴۵ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه و ۱ دقیقه در ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای انجام PCR در نظر گرفته شد. اطلاعات جمع‌آوری شده در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) وارد شد. در سطح آمار توصیفی، از شاخص‌هایی نظیر فراوانی، درصد فراوانی، میانگین و انحراف معیار و در سطح آمار استنباطی، از آزمون‌های Independent t و Fisher's exact Mann-Whitney استفاده و P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۴۳ بیمار مبتلا به کارسینوم پاپیلاری تیروئید، ۳۴ نفر (۷۹/۱ درصد) زن و ۹ نفر (۲۰/۹ درصد) مرد بودند که میانگین \pm انحراف معیار سن آنان، ۱۲/۲۱ \pm ۳۶/۶۹ سال بود. بیان EBNA در ۹ مورد (۲۰/۹ درصد) از نمونه‌ها شناسایی شد همچنین، در بررسی رابطه‌ی جنس با بیان EBNA در بیماران ۲۳/۵ درصد از خانم‌ها و ۱۱/۱ درصد از آقایان مثبت بودند، اما رابطه‌ی معنی‌داری بین جنس و بیان EBNA وجود نداشت (P = ۰/۳۸۰).
 اطلاعات دموگرافیک بیماران در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. خصوصیات دموگرافیک و بالینی بیماران مورد مطالعه

ویژگی	تعداد (درصد)
نتیجه‌ی PCR	منفی ۳۴ (۷۹/۱)
	مثبت ۹ (۲۰/۹)
درگیری غدد	منفی ۳۱ (۷۲/۱)
لنفوای	مثبت ۱۱ (۲۵/۶)
	نامشخص ۱ (۲/۳)
جنسیت	مذکر ۹ (۲۰/۹)
	مؤنث ۳۴ (۷۹/۱)
سن (سال) (میانگین \pm انحراف معیار)	۳۶/۶۹ \pm ۱۲/۲۱

PCR: Polymerase chain reaction

دار دو رشته‌ای همراه با Envelope و کپسید است. این ویروس، در همه جا یافت می‌شود و به طور تقریبی به صورت نهفته در ۹۵ درصد جمعیت جهان وجود دارد. ویروس از طریق بزاق منتقل می‌شود و در سطوح موکوزی اروفارنکس و نازوفارنکس به خصوص در ناحیه‌ی لوزه‌ها رونویسی می‌کند، و سپس، وارد بافت زیرین می‌شود و با چسباندن گلیکوپروتئین Envelope خود به گیرنده‌ی اختصاصی آن، در روی B-cell عفونت ایجاد می‌کند. ویژگی‌های زیستی ویروس، به قدرت ویروس برای تغییر کردن از چرخه‌ی لیتیک به حالت نهفته بر می‌گردد (۵). B-cell آلوده شده با ویروس، به یک منبع مداوم برای تولید اتوانتی‌ژن و اتوانتی‌بادی تبدیل می‌شود. توالی‌های بعضی پروتئین‌های ویروس مثل آنتی‌ژن نوکلئار ۱ و ۲ با اتوانتی‌ژن‌های انسان هومولوژی دارند (۶-۷). در مطالعات مختلف، مشخص شده است که ویروس EBV ارتباط بسیار نزدیکی با بروز بدخیمی‌هایی از جمله لنفوم بورکیت، بدخیمی‌های نازوفارنکس، بیماری هوچکین (Hotchkin's disease) و لنفومای سلول‌های B در بیماران دارای نقص ایمنی دارد (۸). همچنین، در مطالعات بسیاری مشخص شده است که این ویروس، ارتباط نزدیکی با بسیاری دیگر از بدخیمی‌ها دارد (۹-۱۲).

این مطالعه، با هدف بررسی بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Epstein-barr virus (EBNA یا Epstein-barr virus nuclear antigen) به روش PCR در کارسینوم پاپیلاری تیروئید در جمعیتی از بیماران در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۴ انجام شد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، از نوع توصیفی-تحلیلی بود. نمونه‌ی بلوک‌های پارافینی بافت تثبیت شده در فرمالین کارسینوم پاپیلاری تیروئید، از ۴۳ بیمار در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۴ به روش تصادفی انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به سن، جنس، اندازه‌ی تومور و درگیری غدد لنفاوی، از پرونده‌ی بیماران ثبت شد.

بر روی بلوک پارافینی بافت تثبیت شده در فرمالین تومور، به روش Polymerase chain reaction (PCR) کیفی، بیان EBNA در بافت تومور بررسی شد.

DNA با استفاده از کیت استخراج (Qiagen europe) High pure viral nucleic acid kit مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و در فریزر -۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد. برای بررسی EBNA، DNA استخراج شده به همراه دیگر مواد موجود در Master mix و پرایمر/پروب ناحیه‌ی ژنی EBNA که برابر با ۲۹۵ bp و ۲۰۹ bp بودند، با روش Taq-Man PCR و در دستگاه Realtime PCR مدل Applied Biosystems مورد سنجش قرار داده شدند.

EB3 5'-AAGGAGGGTGGTTTGAAAG, EB4 5'-AGACAATGGACTCCCTTAGC

جدول ۲. بررسی مقایسه‌ای عوامل دموگرافیک و بالینی در دو گروه با و بدون بیان آنتی‌ژن هسته‌ای Epstein-barr virus (EBNA) یا Epstein-barr virus nuclear antigen (EBNA) در کارسینوم پاپیلاری تیروئید

متغیرها	بیان ژن	عدم بیان ژن	مقدار P
سن	۴۳/۳۳ ± ۱۴/۶۰	۳۴/۹۴ ± ۱۱/۰۹	۰/۰۴۶
جنس	مؤنث	۲۶ (۷۶/۵)	۰/۶۵۷
	مذکر	۸ (۸۸/۹)	
اندازه‌ی تومور	۲ سانتی‌متر <	۱۳ (۳۸/۲)	۰/۴۴۰
	۲-۴ سانتی‌متر	۱۲ (۳۵/۳)	
	۴ سانتی‌متر >	۹ (۲۶/۵)	
درگیری غدد لنفاوی	منفی	۹ (۲۷/۳)	۰/۵۶۰
	مثبت	۲۴ (۷۲/۷)	

در مطالعه‌ی Kijima این ارتباط تنها با گاستریک کنسر دیده شد و در مورد کارسینوم پاپیلاری تیروئید، ارتباط معنی‌داری یافت نشد (۱۵). همچنین، در مطالعه‌ی دیگری که بر روی سرطان‌های تیروئید صورت گرفت؛ چنین رابطه‌ای مشاهده نشد (۱۶). این در حالی است که در مطالعه‌ی Shimakage و همکاران، نه تنها این ارتباط معنی‌دار بود، بلکه بررسی‌ها حاکی از تأثیر EBV در پیشرفت کارسینوم پاپیلاری به سمت Undifferentiated carcinoma بود و حتی میزان بیان ژن‌های مرتبط با EBV با درجه‌ی تمایز سرطان تیروئید به صورت معنی‌داری ارتباط داشت (۱۷).

مطالعه‌ی Wilson و همکاران بر روی موش‌ها، حاکی از نقش مستقیم احتمالی محصول EBNA-1 در پاتوژنز لنفوم Burkitt و امکان نقش داشتن آن در پاتوژنز دیگر بدخیمی‌های مرتبط با EBV است (۱۷).

نتیجه‌ی قابل توجه دیگر در مطالعه‌ی حاضر، در رابطه با اندازه‌ی تومور است که در بیشتر بیماران متوسط (T2) بود و ارتباط معنی‌داری با بیان EBNA نداشت.

با وجود این که متاستاز به غدد لنفاوی می‌تواند در عود و پیشرفت کارسینوم پاپیلاری تیروئید نقش داشته باشد (۱۸) و در یک مطالعه، نقش EBV در پیشرفت کارسینوم پاپیلاری تیروئید به Undifferentiated carcinoma دیده شده است (۱۷)، در این مطالعه، رابطه‌ی معنی‌داری میان درگیری غدد لنفاوی و بیان ژن EBNA در بیماران مبتلا به کارسینوم پاپیلاری تیروئید یافت نشد.

با توجه به عدم وجود مطالعات کافی در رابطه با موارد بالا، بررسی‌های بیشتر توصیه می‌شود.

در نهایت، با وجود این که در مطالعه‌ی حاضر رابطه‌ای میان بیان EBNA و ویژگی‌های کارسینوم پاپیلاری تیروئید یافت نشد؛ با توجه به نقش این ویروس در بسیاری از بدخیمی‌ها و نتایج بحث برانگیز موجود، مطالعات بیشتر با گنجاندن گروه شاهد در مطالعه پیشنهاد می‌شود.

بررسی رابطه‌ی بیان ژن EBNA با عوامل مختلف با استفاده از آزمون Mann-Whitney نشان داد که سن افراد دارای بیان ژن به طور معنی‌داری بیش از بیماران بدون بیان ژن بود ($P = 0/046$). همچنین، بین بیان ژن EBNA با اندازه‌ی تومور ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P = 0/440$) و بین وجود درگیری غدد لنفاوی نیز در افراد با بیان ژن و بدون آن، اختلاف معنی‌داری یافت نشد ($P = 0/560$) (جدول ۲).

بحث

کارسینوم پاپیلاری تیروئید، شایع‌ترین بدخیمی تیروئید است. مطالعات حاکی از شیوع ۸۸ درصد این کارسینوم در ایالات متحده و ۷۲ درصد در برزیل به عنوان یکی از کشورهای در حال توسعه در بین انواع مختلف کارسینوم تیروئید است. این سرطان، در جنس مؤنث شایع‌تر است؛ به گونه‌ای که در مطالعات مختلف، نسبت‌های ۹/۸:۳ و ۱۴/۹:۳/۹ گزارش شده است (۱۳-۱۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز ۷۹/۱ درصد از مبتلایان مؤنث بودند و نسبت ابتلای جنس مؤنث به جنس مذکر مشابه مطالعات قبلی است. با این وجود، بین بیان EBNA و جنس بیماران رابطه‌ی معنی‌داری یافت نشد.

در این مطالعه، میانگین سنی بیماران نزدیک به ۳۷ سال بود. در بیماران مبتلا به کارسینوم پاپیلاری با بیان EBNA، میانگین سن بیماران به طور معنی‌داری بیش از بیماران بدون بیان ژن بود که می‌تواند ناشی از افزایش احتمال تماس با ویروس EBV به دنبال افزایش سن باشد.

همچنین، در بررسی از نظر ارتباط بیان ژن با شدت درگیری غدد لنفاوی و اندازه‌ی تومور نیز ارتباط معنی‌داری یافت نشد.

مطالعات در مورد ارتباط EBV و کارسینوم پاپیلاری تیروئید به نتایج بحث برانگیزی دست یافته‌اند. در مطالعه‌ی حاضر، در PCR انجام گرفته جهت بررسی بیان EBNA در بافت تومورال، تنها ۲۰/۹ درصد نتیجه‌ی مثبت داشتند.

نهایت تقدیر و تشکر از کارمندان و تکنسین آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان ابراز می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، بر گرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۴۵۷۷ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله،

References

- Keegan TH, Grogan RH, Parsons HM, Tao L, White MG, Onel K, et al. Sociodemographic disparities in differentiated thyroid cancer survival among adolescents and young adults in California. *Thyroid* 2015; 25(6): 635-48.
- Grigsby PW, Reddy RM, Moley JF, Hall BL. Contralateral papillary thyroid cancer at completion thyroidectomy has no impact on recurrence or survival after radioiodine treatment. *Surgery* 2006; 140(6): 1043-7.
- Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016; 26(1): 1-133.
- Shimakage M, Kawahara K, Sasagawa T, Inoue H, Yutsudo M, Yoshida A, et al. Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlates with tumor progression. *Hum Pathol* 2003; 34(11): 1170-7.
- Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 370516.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725.
- Namjou B, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity* 2007; 40(8): 602-12.
- Grywalska E, Markowicz J, Grabarczyk P, Pasiarski M, Rolinski J. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2013; 67: 481-90.
- Shimakage M, Sasagawa T, Kawahara K, Yutsudo M, Kusuoka H, Kozuka T. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int J Cancer* 2001; 92(2): 226-31.
- Sasagawa T, Shimakage M, Nakamura M, Sakaike J, Ishikawa H, Inoue M. Epstein-Barr virus (EBV) genes expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer: a comparative study with human papillomavirus (HPV) infection. *Hum Pathol* 2000; 31(3): 318-26.
- Shimakage M, Sasagawa T. Detection of Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen-2 mRNA by in situ hybridization. *J Virol Methods* 2001; 93(1-2): 23-32.
- Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol* 2002; 33(6): 608-14.
- Veiga LH, Neta G, Aschebrook-Kilfoy B, Ron E, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. *Thyroid* 2013; 23(6): 748-57.
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, et al. Cancer incidence in five continents Vol. IX. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2007.
- Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol* 2001; 64(4): 513-8.
- Shek TW, Luk IS, Ng IO, Lo CY. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the thyroid gland: lack of evidence of association with Epstein-Barr virus. *Hum Pathol* 1996; 27(8): 851-3.
- Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* 1996; 15(12): 3117-26.
- Londero SC, Krogdahl A, Bastholt L, Overgaard J, Trolle W, Pedersen HB, et al. Papillary thyroid microcarcinoma in Denmark 1996-2008: a national study of epidemiology and clinical significance. *Thyroid* 2013; 23(9): 1159-64.

Expression of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA) in Papillary Thyroid Carcinoma in a Population of Patients in Isfahan City, Iran

Mozhgan Mokhtari¹, Mona Bahreini-Isfahani², Faegheh Najji², Ali Safaei³

Original Article

Abstract

Background: Papillary thyroid carcinoma is the most prevalent malignancy of thyroid gland and is significantly lymphotropic. Epstein-Barr virus (EBV) infection may play an important role in the development of this malignancy. The aim of this study was to investigate the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA), as a probable risk factor, in papillary thyroid carcinoma in a population of patients in Isfahan city, Iran, in the year 2015.

Methods: This study was performed on 43 cases of papillary thyroid carcinoma confirmed by pathologist. Using qualitative polymerase chain reaction (PCR) method in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens, EBNA expression in tumor tissue was investigated. Information on age, sex, tumor size, lymph node status and metastasis were collected from the patients' medical records. The collected data were analyzed using independent t and chi-square tests via SPSS software.

Findings: EBNA antigen expression was detected in 9 cases (20.9%). The relationship between different factors and EBNA antigen expression showed a significant relationship between patients' age and gene expression ($P < 0.05$). In contrast, other factors were not significantly correlated with EBNA gene expression ($P > 0.05$).

Conclusion: According to the results of this study, Epstein-Barr virus may have a role in pathogenesis of papillary thyroid carcinoma. Further studies with control group are necessary to confirm the issue.

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV), Papillary thyroid carcinoma, Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)

Citation: Mokhtari M, Bahreini-Isfahani M, Najji F, Safaei A. **Expression of Epstein-Barr-Virus Nuclear Antigen (EBNA) in Papillary Thyroid Carcinoma in a Population of Patients in Isfahan City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2017; 34(415): 1648-52.

1- Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- General Practitioner, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Student of Medicine, Student Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mona Bahreini-Isfahani, Email: bahreini_mona@yahoo.com