

ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی وضعیت رسپتور استروژن و پروژسترون در تومورهای بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آنها با میزان تکثیر و درجه تومور

رباب شیخ‌پور*؛ دانشکده پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد و مرکز تحقیقات خون و آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

چکیده

مقدمه: مهم‌ترین تومورمارکرها در تعیین پیش‌آگهی و نوع درمان سرطان پستان، بروز رسپتورهای استروژن و پروژسترون است. همچنین بیومارکر Ki67 (نشانگر میتوز)، سرعت رشد و تکثیر تومور را نشان می‌دهد، گرید یک عامل تعیین‌کننده در پیش‌آگهی و رفتار تومور است و غدد لنفاوی درگیر یک عامل پیشگویی‌کننده مهم برای قدرت تهاجم سرطان پستان محسوب می‌شود، لذا هدف از انجام این مقاله، ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی رسپتور استروژن و پروژسترون در بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آن با میزان تکثیر و درجه تومور است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی، ۱۸۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان در محدوده سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۲ از بیمارستان شهید صدوقی یزد انتخاب شدند. تکنیک ایمونوهیستوشیمی برای ارزیابی میزان رسپتور استروژن، پروژسترون و تکثیر تومور (Ki67) به کار برده شد. آنالیز آماری با استفاده از تست پیرسون، تای کندال و رگرسیون خطی انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، میانگین میزان بروز ER، PR و Ki67 در افراد مبتلا به سرطان پستان به ترتیب $13/3 \pm 69/16$ ، $58/32 \pm 12/2$ و $26/32 \pm 18/63$ ٪ بود و ارتباط معکوسی بین میزان گیرنده استروژن و پروژسترون با گرید وجود داشت ($P < 0.05$)، اما ارتباطی بین گیرنده استروژن و پروژسترون با تکثیر سلول و سن بیمار وجود نداشت ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان رسپتور استروژن و پروژسترون و تکثیر سلول در تومورهای بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان متفاوت است. همچنین میزان بیان بالای رسپتورهای استروئیدی با کاهش درجه تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان همراه است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، رسپتور استروژن، رسپتور پروژسترون، تکثیر تومور.

*نشانی نویسنده پاسخگو: یزد، دانشکده پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی و مرکز تحقیقات خون و آنکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، رباب شیخ‌پور. نشانی الکترونیک: Robab.Sheikhpour@iauyazd.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان است (۱). هر سال یک میلیون مورد جدید از این بیماری تشخیص داده می‌شود. میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پستان در ایران بالا بوده و بعد از سرطان ریه دومین علل مرگ ناشی از سرطان در زنان است (۲-۷). این بیماری در سنین کمتر از ۲۵ سال نادر است و ۷۷٪ موارد در سنین بالای ۵۰ سال رخ می‌دهد (۸). از آن جا که سیر بالینی سرطان اولیه پستان در هر بیمار متفاوت از سایر مبتلایان است، تعیین سرنوشت نهایی هر بیمار مشخص نیست و شناخت عواملی که بتواند به طور مستقیم و یا غیرمستقیم سرنوشت نهایی بیماران را پیش‌بینی کند، در تصمیم‌گیری بالینی و انتخاب درمان مفید است (۹). درجه تومور یا گرید از عواملی است که در تعیین پیش‌آگهی و رفتار تومور نقش دارد (۱) و بیماران که گرید بالاتری دارند، قدرت تهاجم بیشتر و احتمالاً طول عمر کمتری دارند (۱). درگیری غدد لنفاوی زیر بغل یک عامل پیشگویی‌کننده بسیار مهم برای قدرت تهاجم سرطان پستان محسوب می‌شود (۱۰). مطالعات گزارش کردند بیماران بدون درگیری غدد لنفاوی ۳۰٪ احتمال عود دارند در حالی که بیماران مبتلا به درگیری غدد لنفاوی ۷۵٪ احتمال عود دارند (۸). از ابزارهای مهم دیگر در تعیین قدرت تهاجم بیماری، وضعیت تومورمارکرها در زمان تشخیص است. تومورمارکرها پروتئین‌های برگرفته از بافت‌های سرطانی هستند که در نمونه‌های بافتی یا سرم بیماران سرطانی قابل ارزیابی هستند (۱۱). یکی از این تومورمارک‌هایی که در تعیین پیش‌آگهی و نوع درمان سرطان پستان نقش دارد، بروز رسپتورهای استروژن و پروژسترون است. بررسی وضعیت‌گیرنده‌های استروژن و پروژسترون با استفاده از روش ایمینوهیستوشیمی انجام می‌گیرد و در آن از پادتن‌های ضد گیرنده هورمونی بر روی مقاطع بافتی استفاده می‌شود. سرطان‌هایی که دارای مقادیر بالاتری از گیرنده‌های هورمونی هستند نسبت به آنهایی که فاقد گیرنده هستند پیش‌آگهی بهتری دارند (۱۲). تومورهای پستانی که دارای هر دو نوع گیرنده استروژن و پروژسترون باشند بالاترین شانس رمیسیون به دنبال هورمون درمانی را خواهند داشت. وجود این گیرنده‌ها در تومور پستان پاسخ آنها را به درمان‌های

هورمونی از ۵۵٪ تا ۸۰٪ بالا می‌برد (۱۳). ژن Ki67 بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۰ قرار دارد. محصول ژن Ki67 یک پروتئین غیرهیستونی به نام PCNA proliferating cell nuclear antigen است. PCNA در تمام مراحل چرخه سلولی G2,S,G1 و میتوز فعال است و فقط در سلول‌های در حال استراحت (G0) غیرفعال است. این بیومارکر به عنوان یک نشانگر میتوز، نشان‌دهنده سرعت رشد و تکثیر تومور است و با ارزیابی آن با روش ایمینوهیستوشیمی می‌توان به سرعت تکثیر تومور پی برد (۱۴-۱۷). بنابراین اطلاع یافتن از وضعیت هورمون‌های استروئیدی و میزان تکثیر سلول ارزش پیش‌آگهی فراوانی جهت انتخاب نوع درمان دارد (۱۲). با وجود تحقیقات گسترده در زمینه مارک‌های مولکولی، اختلافات مشاهده شده در نتایج و نیز تاثیر عوامل جمعیتی در بروز این بیومارکرها، اهمیت بررسی مطالعات بیشتر در مناطق گوناگون را خاطر نشان می‌سازد، لذا هدف از انجام این مقاله ارزیابی ایمینوهیستوشیمیایی رسپتور استروژن و پروژسترون در بیماران مبتلا به سرطان پستان و ارتباط آن با میزان تکثیر و درجه تومور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه: در این مطالعه توصیفی تحلیلی، طبق بررسی مقالات مرتبط و حجم جامعه مورد نظر با استفاده از فرمول کوکران به وسیله کارشناس آمار در سطح خطای ۵٪، کلیه زنان مبتلا به سرطان پستان که شامل ۱۸۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان بودند و در محدوده سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۸۹ به بیمارستان شهید صدوقی یزد مراجعه کرده بودند انتخاب شدند. اطلاعات مورد نیاز مانند نوع سرطان، سن و گرید از پرونده بیماران استخراج شد. همچنین میزان بیومارکر رسپتور استروژن و پروژسترون و Ki67 با روش ایمینوهیستوشیمی ارزیابی گردید.

روش ایمینوهیستوشیمی: برای ارزیابی وضعیت گیرنده استروژن، پروژسترون و میزان تکثیر سلول در تومورهای بافتی پستان از روش ایمینوهیستوشیمی استفاده شد. در این روش، تومورهای سرطانی پستان بعد از جراحی در فرمالین ۱۰٪ نگاه‌داری شدند، پس از ۳ ساعت فرمالین تعویض گردید و بعد از ۲۴ ساعت برای انجام پاساژ بافتی، نمونه‌ها در دستگاه Tissue processor قرار گرفتند.

همچنین میانگین میزان تکثیر تومور (Ki67) $18/63 \pm 26/32\%$ بود.

امتیازدهی: بررسی اسلایدهای تهیه شده با روش ایمنوهایستوشیمی با نشانگرهای ER, PR بدین گونه بود که در ۱۰۰ سلول تومور مورد مشاهده، تعداد سلول مثبت (صفر تا ۱۰۰) مشخص گردید. در مورد نشانگر Ki67 نیز درصد سلولهای مثبت از صفر تا ۱۰۰ شماره گذاری گردید و به صورت درصد گزارش شد.

سپس عمل بلوک گیری انجام شد و بلوکهای بافتی به ضخامت ۴ میکرومتر برش زده شدند و بر روی لامهای پلی الایزین دار قرار گرفتند. بعد از پارافین زدایی، عملیات آبیگری و شفاف سازی انجام گرفت. بازبایی آنتی ژن ها با محلول سیترات بافر و دمای ۹۸ درجه سانتیگراد انجام شد. لامها بعد از شستشو با PBS به منظور مهار واکنش زمینه در محلول ۳٪ پراکسید هیدروژن در متانول قرار گرفتند. سپس از آنتی بادی اولیه طبق جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: آنتی بادی اولیه استفاده شده در روش ایمنوهایستوشیمی

Antibody	Dilution	Isotype	Source
Estrogen receptor	Ready for use	Monoclonal mouse anti human1D5	Dako
Progesterone receptor	Ready for use	Monoclonal mouse anti human PGR 636	Dako

شکل ۱ رنگ آمیزی تومورها را با آنتی بادی Monoclonal mouse anti human1D5 و Monoclonal mouse anti human PGR 636 برای تشخیص میزان رسپتور استروژن و پروژسترون نشان می دهد.

جدول ۲: فراوانی انواع هیستولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان

نوع هیستولوژیک تومور	تعداد بیماران	درصد
Infiltrating ductal carcinoma	۱۶۱	۸۷/۵
Infiltrating lobular carcinoma	۱۵	۸/۵
Medulary Carcinoma	۴	۲/۱
Missing system	۴	۲/۱

جدول ۳: خصوصیات بالینی بیماران

Clinicopathological properties	تعداد	درصد
Grade	۱۵	
I	۱۱۵	۸/۱
II	۵۴	۶۲/۵
III		۲۹/۴
Age		
>40 years	۱۱۲	۶۰/۸
< 40 years	۷۲	۳۹/۲
Tumor Size	۵۱	۲۷/۲
>5Cm	۱۳۳	۷۲/۸
< 5 Cm		

بعد از شستشو، از آنتی بادی ثانویه sheep anti mouse, anti-Rabbit (HRP) (Ebne-sina, Tehran) استفاده شد. بعد از شستشو و قرار گرفتن با محلول سوبسترای پراکسیداز دی آمینو بنزیدین، عمل آبیگری، شفاف سازی و چسباندن لامل انجام شد و لامها زیر میکروسکوپ به بزرگنمایی 100x مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین از نمونه کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد، کنترل منفی بدین گونه بود که به جای استفاده از آنتی بادی اولیه از Fetal Bovine Serum استفاده شد.

آنالیز آماری: اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (19 version) مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی متغیرها از آنالیز آماری رگرسیون استفاده شد.

یافته‌ها

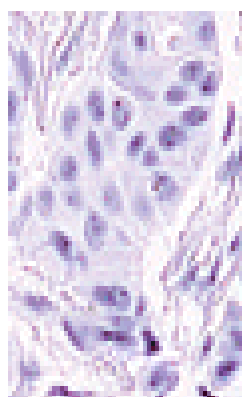
در این مطالعه، ۸۷/۵٪ از بیماران مبتلا به سرطان پستان از نوع Infiltrating Ductal Carcinoma بودند (فراوانی انواع هیستولوژیک سرطان پستان در جدول ۲ نشان داده شده است).

همچنین خصوصیات بالینی بیماران در جدول ۳ نشان داده شده است.

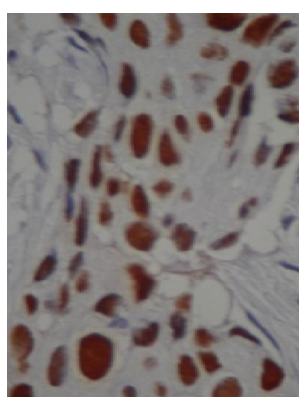
میانگین میزان بروز ER, PR در بیماران مبتلا به سرطان پستان به ترتیب $13/3 \pm 69/16$ ، $12/2 \pm 58/32$ بود.

($P < 0.05$, coefficient correlation = -0.28)، همچنین ارتباطی بین میزان ER و PR با سن بیمار و تکثیر سلول در تومورهای بافتی پستان مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین برای تعیین ارتباط و ضریب همبستگی بین متغیرها از روش رگرسیون خطی آماری استفاده شد. جدول ۴ و ۵ ارتباط بین بیومارکر استروژن و پروژسترون با پارامترهای هیستوپاتولوژی را نشان می‌دهد.

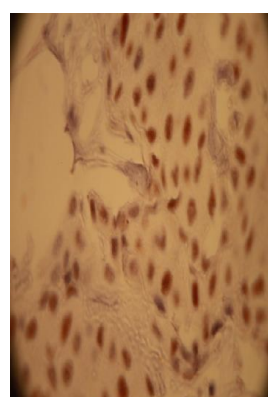
ارتباط بین ER, PR با تکثیر تومور و سن بیمار با استفاده از آنالیز آماری پیرسون نشان داده شده است. همچنین ارتباط بین ER و PR با گرید با استفاده از آنالیز آماری تای کندال محاسبه شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معکوسی بین میزان ER با گرید (-) ($P < 0.01$ coefficient correlation = -0.39) وجود داشت. همچنین ارتباط معکوسی بین میزان PR با گرید مشاهده شد.



ج) نمونه کنترل منفی



ب) رنگ‌آمیزی رسپتور پروژسترون <math>< 90\%</math>



الف) رنگ‌آمیزی رسپتور استروژن <math>< 90\%</math>

شکل ۱: رنگ‌آمیزی تومورها

جدول ۴: ارتباط بین رسپتور استروژن با پارامترهای هیستوپاتولوژی

Dependent variables	میانگین \pm انحراف معیار	correlation		p-value	Regression		
		(r)	(r^2)		β	R-square	p-value
گرید I: ۱۵ II: ۱۱۵ III: ۵۴	-----	*-۰/۳۹	۰/۰۱۵	۰/۰۰۳۴	-۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۰۱
سن بیمار	۴۹/۵ \pm ۸/۳	** -۰/۱۵	۰/۰۲	۰/۰۹۵	-۰/۴۷۰	۰/۰۰۲	۰/۶
تکثیر تومور	۲۶/ ۳۲ \pm ۱۸/ ۶۳	** -۰/۱۰	۰/۰۱۰	۰/۱۵	-۰/۱۳۳	۰/۰۱۸	۰/۱۴

** Pearson / * tau Kendall

جدول ۵: ارتباط بین رسپتور پروژسترون با پارامترهای هیستوپاتولوژی

Dependent variables	میانگین \pm انحراف معیار	Regression					
		correlation (r)	r^2	p-value	β	R-square	p-value
گرید I: ۱۵ II: ۱۱۵ III: ۵۴	-----	*-۰/۲۸	۰/۰۷۸	۰/۰۲	-۰/۱۵	۰/۰۰۲	۰/۰۲۸
سن بیمار	۴۹/۵ \pm ۸/۳	** -۰/۷۱	۰/۵۰۴	۰/۴۴	-۰/۰۷۵	۰/۰۰۵۰	۰/۴۹
تکثیر تومور	۲۶/۳۲ \pm ۱۸/۶۳	** -۰/۰۱۴	۰/۰۰۰۲	۰/۸۸	-۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	۰/۹۱

** Pearson / * tau Kendall

بحث

مبتلا به سرطان پستان با سن بیشتر از ۶۰ سال، به طور معنی‌داری افزایش یافت (۸). در مطالعه Kadivar و همکاران، میزان بیومارکر مثبت ER و PR در گروه سنی بالای ۶۰ سال بیشتر از زیر ۴۰ سال بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و این محققان گزارش کردند که بیان رسپتور استروژن و پروژسترون با سن بروز سرطان ارتباطی ندارد (۲۷) که با مطالعه ما همخوانی داشت. در مطالعه Tabe و همکاران، هم فراوانی موارد مثبت گیرنده‌های استروژن در سنین زیر ۵۰ سال و بالای ۵۰ سال تفاوت معنی‌داری نداشت (۲۳)، آنها برای توضیح این مساله، ارتباط سن با گرید را بررسی کردند و مشخص شد که بیشتر تومورهای درجه یک در سنین زیر ۵۰ سال قرار دارند. در این مطالعه تومورهای درجه یک، بیشترین درصد مثبت بودن گیرنده‌های هورمونی را در بین تومورها تشکیل دادند بنابراین، این یافته همراه با کم بودن نسبی تعداد بیماران تا حدی توانست نتایج وضعیت گیرنده‌های هورمونی با سن را توضیح دهد (۲۳).

بررسی میزان تکثیر سلول‌های تومورال سرطان پستان با روش‌های متفاوت از جمله تخمین درصد سلول‌های Ki67 مثبت به روش ایمینوهیستوشیمی، تا حدودی پیش‌آگهی زنان مبتلا به سرطان پستان را پیشگویی می‌کند (۸). سرعت تکثیر سلولی یک عامل تعیین‌کننده مهم برای رفتار بیولوژیکی و مهاجمی سرطان پستان است و افزایش آن به عنوان شاخص تکثیر سلولی و رشد سلول‌های تومورال ارتباط واضحی با سیر تهاجمی تومور دارد (۲۸).

بروز رسپتورهای استروژن و پروژسترون در پاسخ به درمان و پیش‌آگهی سرطان پستان موثر می‌باشد. ارزیابی وضعیت این گیرنده‌ها به منظور پیش‌بینی پاسخ به درمان‌های ضد استروژنی انجام می‌گیرد (۲۳). مطالعات نشان دادند که تاموکسیفن به عنوان یک داروی آنتی‌استروژنی با مهار گیرنده‌های استروژنی اثر داروهای کیموتراپی را قبل از سنین یائسگی می‌افزاید (۱۹). میزان بروز رسپتور استروژن و پروژسترون در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مطالعات مختلف متفاوت است (۱۸، ۱۹).

به نظر می‌رسد عامل عمده مؤثر در نتایج متفاوت مطالعات، عوامل جمعیتی و نژادی است، تأثیر فاکتورهای قومی و نژادی در ظهور بیومارکرهای سرطان پستان همواره مورد توجه محققان بوده است (۲۴). همچنین عامل دیگری که می‌تواند در نتایج تأثیرگذار باشد حد آستانه مثبت برای نمونه‌ها است (۱۲). در بررسی اسلایدهای تهیه شده با روش ایمینوهیستوشیمی با نشانگرهای ER, PR، تعداد سلول مثبت (صفر تا ۱۰۰) مشخص گردید ولی بعضی از مطالعات دیگر، با در نظر گرفتن حد آستانه‌های متفاوتی به نتایج دیگری دست یافتند (۱۲، ۱۸، ۲۵ و ۲۶).

در این مطالعه ارتباطی بین تظاهر گیرنده‌های استروژن و پروژسترون با سن افراد مشاهده نشد ولی در مطالعه Shaban و همکارانش، تظاهر گیرنده‌های استروژن و پروژسترون در سرطان پستان، به طور قوی با سن بیماران ارتباط داشت، به نحوی که وجود این گیرنده‌ها در زنان

همچنین در مطالعه ما ارتباط معکوسی بین میزان رستپور استروژن و پروژسترون با درجه تومور (گرید) مشاهده شد. Anim و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند کاهش درجه تومور با افزایش میزان گیرنده‌های استروژن و پروژسترون همراه است (۳۴). Mirzae و همکاران، وضعیت تومورمارکرهایی مانند رستپور استروژن و پروژسترون را با گرید مورد بررسی قرار دادند و ارتباط معناداری بین آنها مشاهده نکردند ولی گزارش کردند بیمارانی که گرید بالاتری دارند، قدرت تهاجم بیشتر و احتمالاً طول عمر کمتری دارند (۳۵).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان رستپور استروژن، پروژسترون و تکثیر سلول در تومورهای بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان متفاوت است. ارزیابی وضعیت این بیومارکرها اطلاعات پروگنوستیک ارزشمند برای پزشکان، در پاسخ به درمان فراهم می‌کند با توجه به اینکه تاکنون مطالعه مشابهی در این منطقه انجام نشده بود، بررسی حاضر می‌تواند مبنایی برای مطالعات گسترده‌تر در منطقه باشد.

۲۹). تومورهایی که میزان بالاتری از Ki67 را دارند، به داروهای شیمی‌درمانی پاسخ مطلوب‌تری می‌دهند. بنابراین دانستن وضعیت Ki67 و اطلاع یافتن از وضعیت تکثیر سلولی در تصمیم‌گیری‌های درمانی تاثیر بسزایی خواهد داشت (۳۰). در این مطالعه ارتباطی بین میزان رستپور استروژن و پروژسترون با سرعت تکثیر سلولی در سرطان پستان مشاهده نشد. Sistani هم در مطالعه خود ارتباط معناداری بین گیرنده استروژن و نشانگر تکثیر سلولی Ki67 مشاهده نکرد (۱۲)، اما Jensen و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که حضور گیرنده استروژن $E\alpha$ در اپیتلیوم سرطان پستان با کاهش میزان بیان تکثیر سلولی (Ki67) همراه است (۳۱). در مطالعه مورد نظر، ارتباطی بین گیرنده‌های استروژن و پروژسترون با تکثیر تومور مشاهده نشد. Zaslowski و همکاران طی مطالعه دیگری که بر روی زنان مبتلا به سرطان پستان انجام دادند، ارتباط منفی و معناداری بین میزان گیرنده‌های پروژسترون و Ki67 مشاهده نمودند و گزارش کردند که بیان گیرنده‌های پروژسترون با کاهش تکثیر تومور همراه است (۳۲) ولی Anderson و همکاران مطالعه‌ای بر روی زنان مبتلا به سرطان پستان انجام دادند و ارتباطی بین میزان گیرنده‌های استروژن، پروژسترون با میزان تکثیر تومور مشاهده نکردند (۳۳).

References

1. Nishimukai A, Yagi T, Yanai A, Miyagawa Y, Enomoto Y, Murase K, Imamura M, Takatsuka Y, Sakita I, Hatada T, Miyoshi Y. High Ki-67 Expression and Low Progesterone Receptor Expression Could Independently Lead to a Worse Prognosis for Postmenopausal Patients With Estrogen Receptor-Positive and HER2-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2014; 12:007
2. Sheikhpour R, Mohiti J. The effect of progesterone on p53 protein in T47D in cell line. *Urmia Med J* 2014; 25(10): 954-60.
3. Hida AI, Bando K, Sugita A, Maeda T, Ueda N, Matsukage S, Nakanishi M, Kito K, Miyazaki T, Ohtsuki Y, Oshiro Y, Inoue H, Kawaguchi H, Yamashita N, Aogi K, Moriya. Visual assessment of Ki67 using a 5-grade scale (Eye-5) is easy and practical to classify breast cancer subtypes with high reproducibility. *J Clin Pathol* 2015: 11.
4. Li H, Han X, Liu Y, Liu G, Dong G. Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Oncol Lett* 2015; 9(1):149-52.
5. Sheikhpour R, Taghipour P. Evaluation of Tp53 codon 72 polymorphism and resulted protein in breast cancer patients in Yazd city. *Breast cancer disease* 2014; 7(3): 20-9.
6. Lyon IAFRoC: World Cancer Report. IARC 2003;188-93.
7. Sheikhpour R, Ghasemi N, Yaghmaei P, Mohiti J, Shirvazdi M.

- Immunohistochemical assessment of p53 protein and its correlation with clinicopathological parameters in breast cancer patients. *Indian J Sci Technol* 2014; 7(4): 472-9.
8. Alizadeh SA, Moshfeghi K, Kalantari M, Ebrahimi Kh. Lymph-node involvement and tumor markers in patients with breast cancer. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* 2010; 12(4): 44-5.
 9. Shams A, Keyhanian Sh, Ghafari F, Sarori mansour. Relation between Her-neu with estrogen and progesterone receptor and p53 in breast cancer patients. *Irania Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 2009; 43.
 10. Gohari MR, Mokhtari Hesari P, Moghaddami Fard Z, Khodabakhshi R. Determining pattern of metastasis and prognostic factors in breast cancer using conditional regression model (PWP). *Scientific Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research* 2014; 12(1): 41-51.
 11. Shahidsales S, Hosseini S, Ahmadi-Simab S, Ghavam- Nasiri M. The importance of Prognostic factors (ER, PR, P53) in breast cancer and their relationship with stage of disease. *Mashhad Univ Med Sci* 2014; 57(2):57-463.
 12. Sharif Sistani N, Sadeghian M.H, Homaei F, Haghghati F. Immunohistochemical Study of cell proliferation marker, estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma. *Birjand Univ med Sci* 2006; 13(3): 38-45.
 13. Naghshvar F, Torabizadeh Zh, Emadian O, Zare A, Ghahremani M. Status of estrogen, progesterone receptors and HER-2/neu expression in invasive breast cancer. *Gorgan Uni Med Sci* 2007; 8(4): 64-67.
 14. Golmohammadi R, Pejhan A. Gene expression of cell proliferative marker Ki67 in breast cancer. *Gorgan Univ MED SCI* 2011; 13(3): 65-71.
 15. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol* 2010; 4:15-34.
 16. Xu L, Liu YH, Ye JM, Zhao JX, Duan XN, Zhang LB, et al. [Relationship between Ki67 expression and tumor response to neoadjuvant chemotherapy with anthracyclines plus taxanes in breast cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2010; 15;48(6): 450-3.
 17. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI* 2009; 101(10): 736- 50.
 18. Gadelkarim Ahmed H, Al-Adhraei MA, Al-Thobhani AK. Correlations of Hormone Receptors (ER and PR), Her2/neu and p53 Expression in Breast Ductal Carcinoma Among Yemeni Women. *Open Canc Immunol* 2011; 4:1-9.
 19. Moghani M, Mokhtariyan K. Correlations of estrogen or progesterone receptors with grade of invasive ductal carcinomas of the breast in women referred to pathology center in Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. *Shahr kord Univ Med Sci* 2009; 11(3): 40-6.
 20. Sterier M. Immunohistochemical and biomedical measurement of estrogen and progesterone receptor in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factor. *Ann Surg* 1993; 218(1): 13-21.
 21. Anim JT, John B, Abdulsathar S AS, Prasad A, Saji T, Akhtar N, et al. Relationship between the expression of various markers and prognostic factors in breast cancer. *Acta Histochem* 2005; 107(2):87-93.
 22. Thike AA, Chang Ma. Immunohistochemical expression of hormones receptor in invasive breast carcinoma: correlation of results of H score with pathological parameters. *Pathol* 2001; 33(1): 21-5.
 23. Tabei Z, Ashraf M. Estrogen and progesterone in 140 breast cancer patients. *Iranian J Endocrinol metabol* 2004; 1: 1-8.
 24. Moradi M, Homaei F, Shamsian A, Eftekhazadeh I. Relationship between age

- and estrogen, progesteron, ki-67 and Her-2 / neu tumor marker in breast tumor. *J breast canc disease* 2010; 3(1 and 2): 7-13.
25. Penault-Llorca F, Andre F, e Sagan Ch, Lacroix-Triki M, Denoux Y. Ki67 Expression and Docetaxel Efficacy in Patients With Estrogen Receptor– Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(17): 2809-16.
 26. Shafigh E, Y Abdolazimi, SH Shafaei , M Haji Ahmadi. Expression of p53, p27 cancer and their correlation with clinicopathological parameters in Shaheed beheshti hospital. *Babol Univ Mel Sci* 2007; 9(4): 7-14.
 27. Kadivar M, Bozorgmehr N. Study of Cytologic Grading of Samples Obtained from Breast Carcinoma Cases Referred to Milad and Rasoul-e-Akram Hospitals between 2004 and 2005. *Iran Univ Med Sci* 2007; 14(54): 129-138
 28. Sezgin Alikanoğlu A, Yıldırım M, Süren D, Kargı A, Yıldız M, Sezer C, Tutuş B. Bcl-2 and Ki-67 Expression in Young Women with Breast Cancer. *J Clin Anal Med* 2013; 4(5): 386-9.
 29. Park D, Kåresen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch* 2007; 451: 11-8.
 30. Mirmalek SA, Elham Kani F. Clinical Application of Breast Cancer Biology. *Iranian J Surg* 2009; 1(17): 1-17.
 31. Jense E, Cheng G, Palmieri C, Saji Sh. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *PNAS* 2001; 98(26):15197-202.
 32. Zaslowski R, Surowiak P, Paluchowski P, Dziegiel P, Maciejczyk A, Pudelko M, Wojnar A, Zabel M. Differences in oestrogen and progesterone receptors, HER-2, p53 expression and proliferation in ductal breast cancers in relation to histopathological grade. *Folia Morphol (Warsz)* 2005; 64(1):9-15.
 33. Anderson H, Hills M, Zabaglo L, A'Hern R, Leary AF, Haynes BP. Relationship between estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and Ki67 expression and efficacy of aromatase inhibitors in advanced breast cancer. *Annals of Oncology* 2011; 1: 1-7.
 34. Anim JT, John B, AbdulSathar SA, et al. Relationship between the expression of various markers and prognostic factors in breast cancer. *Acta histochemica* 2005; 107: 87-93.
 35. Reza Mirzaei H, Sabahat A, Fatemeh Nasrollahi, Mohammadi- Yeganeh L. Correlation between ER, PR, HER2 receptors and prognostic factors in breast cancer. *Pajohandeh* 2010; 15(4): 152-6.