# بررسی بیان ایمونوهیستوشیمی مارکر NQO1 در ضایعات پیش بدخیم و کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهانه رحم و ارتباط آن با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک

دکتر امیرحسین جعفریان[۱]، دکتر نعما محمدیان روشن[۲]، دکتر معصومه غریب[۲]، دکتر حسن مهراد مجد[۳]، دکتر اسما احراری رودی[۴*]

۱. استاد گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲. دانشیار گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استادیار گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. متخصص آسیب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۷/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۷

## خلاصه

**مقدمه:** بدخیمی دهانه رحم، جزء مهم‌ترین سرطان‌های زنان می‌باشد که سیر ابتلاء به آن با توجه به وجود ضایعات پیش بدخیم، منحصر به‌فرد می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به ضایعات پیش بدخیم و کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و مقایسه آن با ضایعات بدون دیسپلازی انجام شد.

**روش‌کار:** در این مطالعه مقطعی، بلوک‌های پارافینی بیماران مبتلا به SCC دهانه رحم و درجات مختلف دیسپلازی و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک در دوره زمانی سال ۹۹-۱۳۹۷ به‌عنوان گروه کنترل از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان قائم مشهد از نظر میزان بیان پروتئین NQO1 به‌روش ایمونوهیستوشیمی توسط آنتی‌بادی مونوکلونال موشی علیه NQO1 انسانی بررسی و ارتباط آن‌ها با اطلاعات دموگرافیک بیماران، ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک بیماری و داده‌های بقاء بیماران بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون‌های کای دو، دقیق فیشر، آنالیز واریانس، آزمون‌های تعقیبی توکی و آزمون لاگ رنک انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه ۱۵۲ فرد شامل ۳۱ بیمار مبتلا به SCC دهانه رحم، ۹۱ بیمار با درجات مختلف دیسپلازی و نیز ۳۰ فرد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک بررسی شدند. فراوانی بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 در بیماران SCC، CIN3، CIN2 و CIN1 و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک به‌ترتیب ۹۶/۸٪، ۹۶/۷٪، ۷۳/۳٪، ۶/۵٪ و ۳/۳٪ بود (p<۰/۰۰۰۱). بین میزان بیان پروتئین NQO1 با نوع تومور (p=۰/۹۹)، درگیری گره لنفاوی (p=۰/۳۳) و میزان تمایز (p=۰/۴۰) ارتباط معناداری مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** بیان پروتئین NQO1 در ضایعات با دیسپلازی شدید بیشتر از دیسپلازی متوسط و در ضایعات با دیسپلازی متوسط بیشتر از ضایعات دیسپلاستیک خفیف می‌باشد که این موضوع نشان‌دهنده نقش احتمالی تغییرات بیان پروتئین NQO1 در پیشرفت و افزایش شدت دیسپلازی این ضایعات می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** بیان پروتئین NQO1، پیشرفت بیماری، سرطان دهانه رحم، کارسینوم سلول اسکوآموس

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر اسما احراری رودی؛ مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران. **تلفن:** ۰۵۱-۴۴۰۱۸۱۳۱؛ **پست الکترونیک:** ahrarira841@gmail.com

## مقدمه

سرطان دهانه رحم از شیوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار بوده که علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در روش‌های درمانی، میزان مرگ‌ومیر بالایی دارد (۱)، به‌همین علت امروزه تلاش گسترده‌ای جهت کشف تغییرات ژنی و تغییرات بیان پروتئین‌های سلول‌های بدخیم و ضایعات پیش‌بدخیم با هدف بهبود فرآیندهای تشخیصی، فهم بهتر پاتوژنز و فرآیند پیشرفت بیماری و در نهایت درمان مؤثرتر از طریق پزشکی شخصی[1] انجام شده است.

یکی از مسیرهایی که امروزه مورد بررسی قرار گرفته، آنزیم NAD (P) H-quinone oxidoreductase 1 (یا NQO1) و تغییر آن در بدخیمی‌ها می‌باشد. پروتئین NQO1 یک آنزیم در سلول‌های طبیعی است که نقش اساسی در حفاظت سلول‌های نرمال از آسیب‌های مواد اکسیدان و کارسینوژن دارد (۴-۲). شواهد حاصل از مطالعات اخیر، جنبه‌های منفی عملکردی آنزیم NQO1 را نشان داده‌اند؛ به‌طوری‌که سطوح افزایش یافته NQO1 در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان، کارسینوما سروز تخمدان (۵)، کارسینوما دهانه رحم (۶)، سلول‌های کوچک ریه (۷) و سلول‌های کلانژیوکارسینوما (۸) گزارش شده است.

بر اساس جستجوی محققین، علی‌رغم پژوهش‌های متعدد در خصوص بیان پروتئین NQO1 در بدخیمی‌های مختلف، در خصوص نقش این آنزیم در کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم به جز مطالعه ما و همکاران (۲۰۱۴) (۶) و هو و همکاران (۲۰۱۰) (۹) گزارش دیگری یافت نگردید. اولین مطالعه‌ای که در آن به نقش احتمالی NQO1 در کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم پرداخته بود، توسط هو و همکاران (۲۰۱۰) (۹) گزارش گردید. آن‌ها در مطالعه خود به ارزیابی پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی[2] ژن NQO1 پرداختند و نشان دادند که پلی‌مورفیسم عملکردی[3] در کدون NQO1 SNP609 با افزایش خطر ابتلاء به بدخیمی دهانه رحم به‌خصوص در صورت آلودگی همزمان به HPVهای پرخطر (۱۶ و ۱۸) همراهی دارد. مطالعه دیگر در این خصوص؛ مطالعه ما و همکاران (۲۰۱۴) (۶) بود که به بررسی بیان NQO1 در بیماران مبتلا به بدخیمی دهانه رحم پرداخته و نشان دادند که بیان افزایش یافته این پروتئین با تمایز ضعیف‌تر تومور، مرحله پیشرفته‌تر بیماری، متاستاز به گره‌های لنفاوی و همچنین بقاء کاهش یافته همراهی دارد. به‌نظر می‌رسد مطالعات بیشتری جهت تبیین نقش این ژن در سرطان دهانه رحم نیاز است، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان ایمونوهیستوشیمی مارکرNQO1 در کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سرویکس و ارتباط آن با فاکتورهای کلینیکو پاتولوژیک انجام شد.

مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به ضایعات پیش بدخیم و کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و مقایسه آن با ضایعات بدون دیسپلازی انجام شد.

## روش‌کار

در این مطالعه مقطعی، بلوک‌های پارافینه ۱۵۲ فرد شامل ۳۱ بیمار مبتلا به SCC دهانه رحم، ۹۱ بیمار با درجات مختلف دیسپلازی (۳۱ نفر CIN-1، ۳۰ نفر CIN-2 و ۳۰ نفر CIN-3) و نیز ۳۰ فرد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک به‌عنوان گروه کنترل از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان قائم انتخاب (در دوره زمانی سال ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹) شده و از نظر میزان بیان پروتئین NQO1 به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شدند. روش انتخاب نمونه‌ها، نمونه‌گیری غیرتصادفی و در دسترس بود. پیش از اجرای طرح، پروتکل مطالعه در کمیته اخلاق سازمانی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به تأیید رسید (IR.MUMS.MEDICAL.REC.1397.372).

جهت انجام ایمونوهیستوشیمی از کیت sc-32793: NQO1 (A180) حاوی آنتی‌بادی منوکلونال موشی علیه NQO1 انسانی، ساخت شرکت SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC کشور آمریکا استفاده شد. در ابتدا برش‌های ۴-۳ میکرونی از

[1] personalized medicine
[2] Single nucleotide polymorphism
[3] Functional polymorphisms

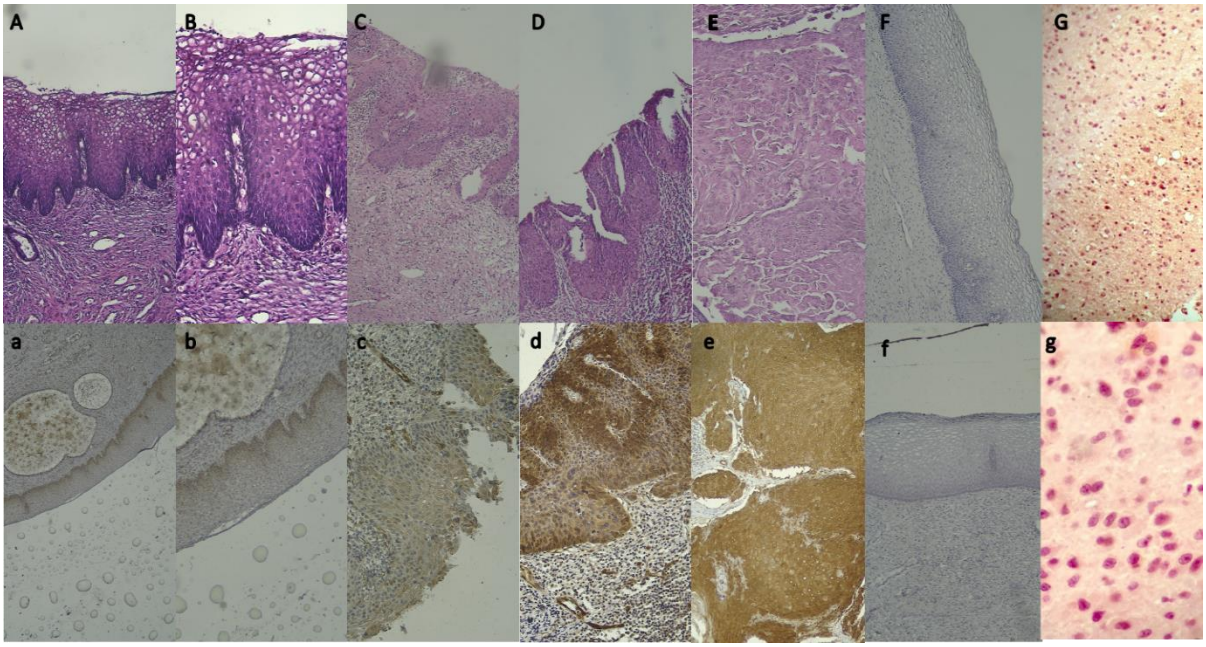
بلوک‌های پارافینی تهیه گردید. پس از ارزیابی کمّی و کیفی کانون‌های تومورال (سرطان دهانه رحم) و نشان‌دار کردن کانون درگیری، نمونه‌های برش خورده به‌مدت ۳۵ دقیقه در فور ۶۰ درجه (یا یک روز کامل در دمای محیط) نگهداری شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها ابتدا در سه ظرف حاوی گزیلول هرکدام به‌مدت ۱۳ دقیقه و سپس در سه ظرف حاوی الکل هرکدام به‌مدت ۷ دقیقه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها تحت شست‌وشو قرار گرفته و در یک ظرف آب مقطر به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله بعد، نمونه‌های تهیه شده به‌مدت ۳۵ دقیقه در محلول رتریوال ۱۰٪ داخل بن‌ماری در حال جوش قرار داده شدند. بعد از سرد شدن نمونه‌ها، شست‌وشو با آب مقطر به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در داخل ظرفی حاوی پراکسیداز ۵٪ نگهداری شدند. بعد از شست‌وشوی نهایی با آب مقطر، نمونه‌ها در معرض آنتی‌بادی اولیه قرار گرفتند.

در این مطالعه دو پاتولوژیست لام‌های رنگ‌آمیزی شده با H&E را از جهات مختلف بررسی کرده و بلوک پارافینی مناسب برای هر بیمار جهت بررسی ایمونوهیستوشیمی با مارکر NQO1 انتخاب شدند. سپس رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر روی لام‌های تهیه شده از بلوک پارافینی منتخب، انجام گردید و توسط دو پاتولوژیست مشاهده و درصد بیان نتایج به‌صورت -، +، ++، +++ گزارش گردید. در صورت وجود اختلاف‌نظر، طی یک جلسه توافقی رفع اختلاف شد. هر دو الگوی بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای NQO1 مثبت در نظر گرفته شد (شکل ۱). در نهایت نتایج درصد بیان به‌صورت ذیل دسته‌بندی می‌شود (۶): "-" یعنی هیچ سلولی رنگ نگرفته یا کمتر از ۵٪ مثبت شده، "+" بین ۲۵-۵٪ سلول‌ها مثبت شده‌اند، "++" بین ۵۰-۲۵٪ سلول‌ها مثبت شده‌اند و "+++" بیشتر از ۵۰٪ سلول‌ها مثبت گزارش می‌شود. جهت بررسی شدت بیان، نمره‌دهی بر اساس مشاهده اساتید راهنما بین ۳-۱ در نظر گرفته شد. در صورت تفاوت در امتیازات، نظر استاد مشاور در خصوص شدت بیان در نظر گرفته شد. در نهایت نمره شدت (۳-۱) و درصد بیان (۳-۰) جمع و نمره نهایی محاسبه گردید. در مطالعه حاضر جهت کنترل منفی از بافت تومورال بدون اضافه کردن آنتی‌ژن اولیه در مراحل اولیه ایمونوهیستوشیمی و جهت کنترل مثبت از بافت گلیوبلاستوما استفاده گردید (شکل ۱). درجه بدخیمی نیز به تأیید دو متخصص آسیب‌شناسی رسید.

پیامد مورد استفاده برای محاسبه حجم نمونه در این مطالعه، فراوانی بیماران با بیان افزایش یافته NQO1 در بیماران مبتلا به SCC و دیسپلازی و گروه کنترل بود. حجم نمونه بر اساس نتایج ما و همکاران (۲۰۱۴) (۶) با در نظر گرفتن کمترین فراوانی بیان افزایش یافته NQO1 (معادل ۲۸٪) که مربوط به گروه CIN-1 می‌باشد و با در نظر گرفتن فراوانی در گروه کنترل که معادل ۴٪ می‌باشد، در سطح خطای آلفای ۵٪ و بتای ۰/۲ با استفاده از نرم‌افزار National Council for the Social Studies، معادل ۳۱ نفر محاسبه گردید که با توجه به اینکه این مقدار برای گروه‌های دیگر عدد کمتری تخمین زده شد، لذا برای تمامی گروه‌ها حجم نمونه معادل ۳۱ نفر در نظر گرفته شد.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای محاسبه ارتباط بین بیان NQO1 و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک مختلف از قبیل شدت بیماری، نوع تومور، درجه بدخیم و عود از آزمون کای دو (و یا در صورت نیاز آزمون دقیق فیشر) و جهت مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد که در صورت وجود نتایج معنادار، از آزمون‌های تعقیبی posthoc از قبیل توکی جهت بررسی دوبه‌دوی گروه‌ها استفاده گردید. جهت آنالیز بقاء، ضمن ارائه منحنی‌های کاپلان مایر[1]، از آزمون لاگ رنک[2] جهت مقایسه بین گروه‌ها استفاده گردید. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[1] The Kaplan–Meier survival curve
[2] The logrank test




**شکل ۱- نمای میکروسکوپی و ایمنوهیستوشیمی انجام شده در افراد مورد بررسی. نمای میکروسکوپی سرویکس با دیسپلازی خفیف در H&E با بزرگ‌نمایی ۱۰۰(A) × و ۲۰۰ (B) × همراه با الگوی رنگ‌پذیری NQO1 ایمنوهیستوشیمی (a با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و b با بزرگ‌نمایی ۲۰۰×). C) نمای میکروسکوپی سرویکس با دیسپلازی متوسط در رنگ‌آمیزی H&E با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و c)؛ الگوی رنگ‌پذیری NQO1 در ایمنوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی ۲۰۰×. D) نمای میکروسکوپی سرویکس با دیسپلازی شدید در رنگ‌آمیزی H&E با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و d)؛ الگوی رنگ‌پذیری NQO1 در ایمنوهیستوشیمی با بزرگ‌نمایی ۲۰۰×: رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی شدید در ۷۵٪ سلول‌های دیسپلاستیک. E) نمای میکروسکوپی کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سرویکس در رنگ‌آمیزی H&E با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و e)؛ الگوی رنگ‌پذیری ایمنوهیستوشیمی مارکر NQO1 در SCC سرویکس با بزرگ‌نمایی ۲۰۰×: رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی شدید در ۱۰۰٪ سلول‌های تومورال. بافت سرویکس بدون دیسپلازی در رنگ‌آمیزی H&E با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× (F) و رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی NQO منفی f، G و g: کنترل مثبت بیان مارکر NQO به‌ترتیب با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و ۴۰۰×**

## یافته‌ها

در این مطالعه ۳۱ بیمار مبتلا به SCC دهانه رحم، ۳۱ نفر مبتلا به CIN-1، ۳۰ نفر مبتلا به CIN-2، ۳۰ نفر مبتلا به CIN-3 و نیز ۳۰ فرد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک تحت بررسی قرار گرفتند. میانگین سن بیماران مبتلا به SCC دهانه رحم، CIN-1، CIN-2، CIN-3 و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک به‌ترتیب ۴۹/۸±۱۱/۶، ۴۳/۲±۷/۱، ۴۰/۸±۶/۴، ۴۱/۹±۵/۶ و ۴۲/۷±۴/۴ سال بود که بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس، بین واحدهای پژوهش از نظر میانگین سنی اختلاف معناداری وجود داشت (p=۰/۰۰۱). بر اساس نتایج آنالیز تعقیبی توکی، بیماران SCC نسبت به بیماران مبتلا به CIN-1 (p=۰/۰۰۳)، CIN-2 (p=۰/۰۰۱)، CIN-3 (p<۰/۰۰۰۱) و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک (p=۰/۰۰۸) از میانگین سنی بالاتری برخوردار بودند که اختلاف مشاهده شده معنادار گزارش گردید. در مقایسه بیان NQO1 در بین بیماران با آسیب‌شناسی‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس، از نظر درصد بیان (p<۰/۰۰۰۱)، شدت بیان (p<۰/۰۰۰۱) و نمره نهایی (مجموع درصد و شدت بیان) (p<۰/۰۰۰۱) پروتئین NQO1 بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معناداری وجود داشت. در قدم بعدی، از آنالیز تعقیبی توکی استفاده شد که نتایج در نمودار ۱ آمده است.

در مجموع در مطالعه حاضر بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 (بیشتر از ۲۵٪) در ۸۴ نفر (۵۵/۲٪) و بیان

پایین پروتئین NQO1 (کمتر از ۲۵٪) در ۶۸ نفر (۴۴/۸٪) گزارش گردید. در بررسی فراوانی الگوی بیان NQO1 برحسب نوع آسیب‌شناسی، بر اساس نتایج آزمون کای‌دو، فراوانی بیان افزایش یافته NQO1 در بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معناداری داشت (p<۰/۰۰۰۱)؛ به بیان دیگر، با افزایش شدت بیماری، فراوانی افراد با بیان بالای مارکر نیز افزایش یافته بود. در ادامه میزان بیان NQO1 بر اساس متغیرهای مختلف در بیماران مبتلا به بدخیمی دهانه رحم بررسی می‌شود که بر اساس نتایج آزمون دقیق فیشر، توزیع فراوانی بیان افزایش یافته NQO1 برحسب نوع تومور (p=۰/۹۹۹)، درگیری متاستاتیک گره‌های لنفی (p=۰/۳۳۳)، میزان تمایز تومور (p=۰/۴۰۰) و برحسب عود (p=۰/۹۹۹) تفاوت معناداری نداشت (جدول ۱).

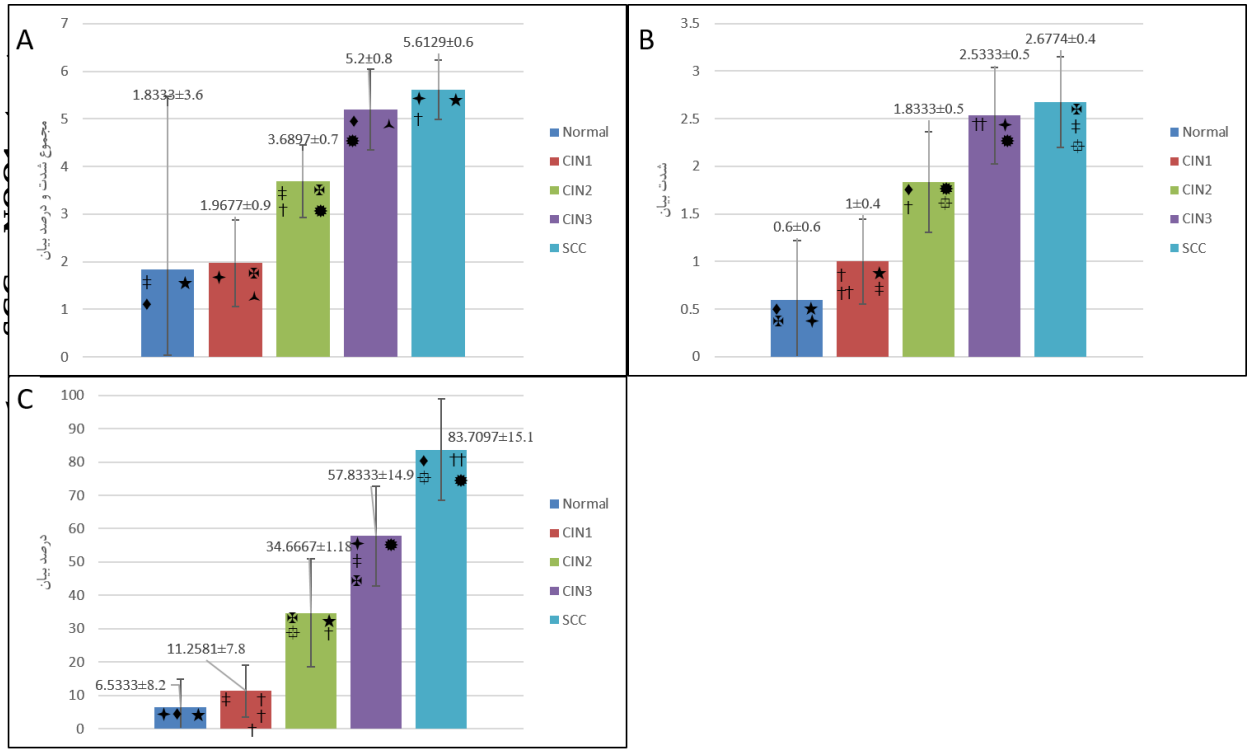
میانه کلی بقاء در بیماران مورد مطالعه (۱۰۰/۱-۳۳/۸ CI ٪۹۵) ۶۷ ماه بود. در ادامه آنالیز بقاء برحسب ویژگی‌های کلینوپاتولوژیک در بیماران مبتلا به سرطان مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج، میانه بقاء در بیماران مرحله ۱ و ۲ به‌ترتیب ۶۷ و ۳۸ ماه بود (p=۰/۰۳۵). همچنین بقاء بیماران با درگیری مارژین جراحی و همچنین درگیری گره‌های لنفاوی به‌طور معناداری کمتر بود (p=۰/۰۰۱). بین سایز تومور و عمق تهاجم با بقاء بیماران ارتباط معناداری مشاهده نشد (جدول ۲، نمودار ۲).

**جدول ۱- مقایسه بیان پروتئین NQO1 در بین افراد مورد مطالعه**

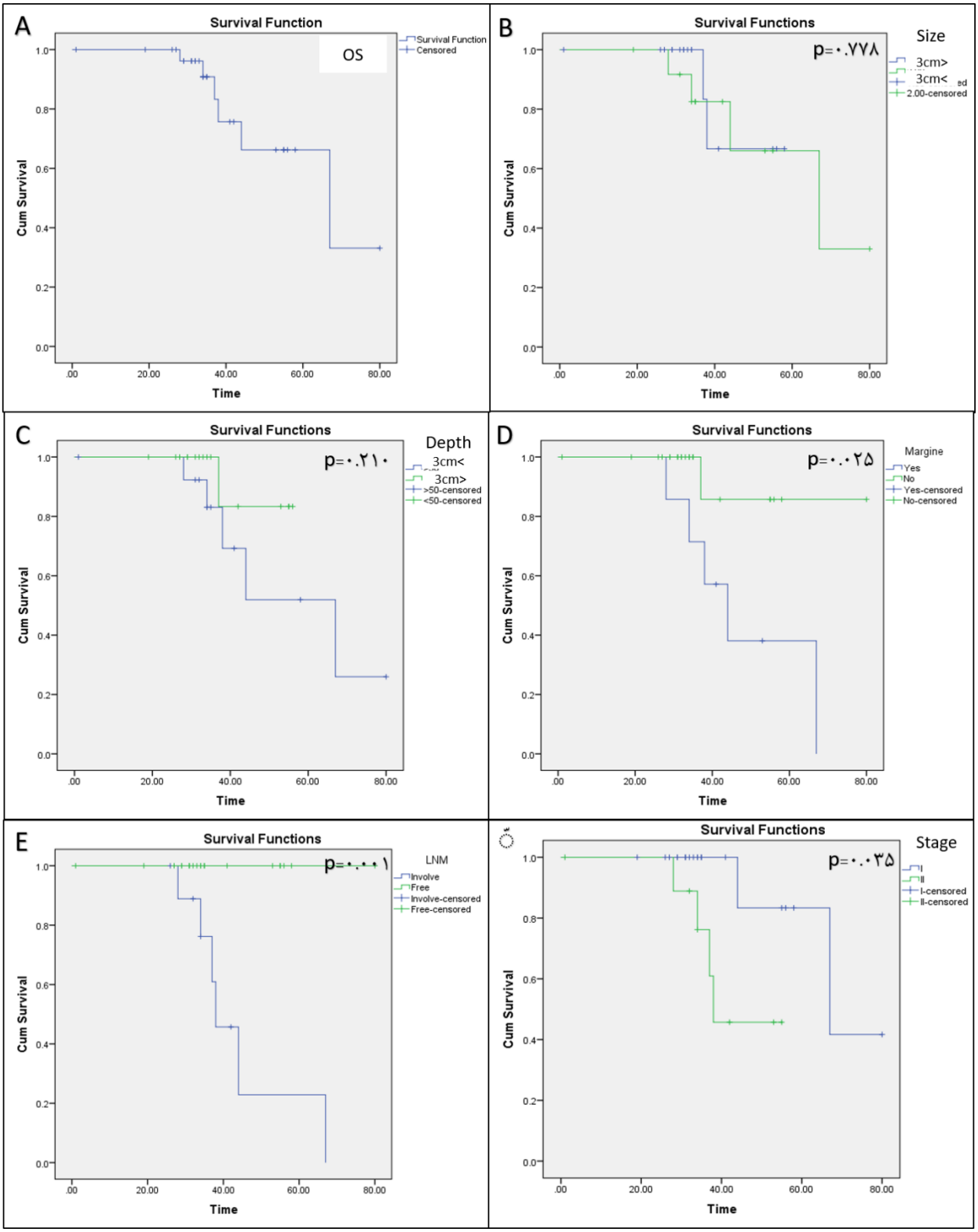
| | جامعه مورد بررسی | خصوصیت | گروه بیان پایین (۶۸ نفر) | گروه بیان بالا (۸۴ نفر) | سطح معنی‌داری |
|---|---|---|---|---|---|
| کل جامعه تعداد (درصد) | آسیب‌شناسی بدون دیسپلازی | | ۲۹ (۹۶/۷) | ۱ (۳/۳) | p<۰/۰۰۰۱ |
| | CIN1 | | ۲۹ (۹۳/۵) | ۲ (۶/۵) | |
| | CIN2 | | ۸ (۲۶/۷) | ۲۲ (۷۳/۳) | |
| | CIN3 | | ۱ (۳/۳) | ۲۹ (۹۶/۷) | |
| | SCC | | ۱ (۳/۲) | ۳۰ (۹۶/۸) | |
| بیماران SCC تعداد (درصد) | نوع تومور | کراتینیزه | ۰ (۰) | ۸ (۱۰۰) | ۰/۹۹۹ |
| | | غیرکراتینیزه | ۱ (۴/۳) | ۲۲ (۹۵/۷) | |
| | درگیری گره لنفاوی | دارد | ۱ (۱۰) | ۹ (۹۰) | ۰/۳۳۳ |
| | | ندارد | ۰ (۰) | ۲۱ (۱۰۰) | |
| | میزان تمایز | خوب | ۰ (۰) | ۵ (۱۰۰) | ۰/۴۰۰ |
| | | متوسط | ۰ (۰) | ۱۸ (۱۰۰) | |
| | | ضعیف | ۱ (۱۲/۵) | ۷ (۸۷/۵) | |
| | عود | دارد | ۰ (۰) | ۵ (۱۰۰) | ۰/۹۹۹ |
| | | ندارد | ۱ (۳/۸) | ۲۵ (۹۶/۲) | |

**جدول ۱- مقایسه بقاء کلی بیماران سرطان دهانه رحم مرحله ۱ و ۲**

| | خصوصیت | میانه (ماه) | ٪۹۵ CI | سطح معنی‌داری |
|---|---|---|---|---|
| مرحله | ۱ | ۶۷ | ۹۹/۹-۳۴ | ۰/۰۳۵ |
| | ۲ | ۳۸ | ۱۰۰/۱-۳۳/۸ | |
| سایز | < ۳ سانتی‌متر | ۵۱/۶ | ۵۸/۹-۴۳/۴۳ | ۰/۷۷۸ |
| | > ۳ سانتی‌متر | ۶۱/۲ | ۷۴/۳-۴۸/۰ | |
| عمق تهاجم | < ٪۵۰ | ۵۶/۳ | ۷۰/۰-۴۲/۶ | ۰/۲۱۰ |
| | > ٪۵۰ | ۵۲/۸ | ۵۸/۴-۴۷/۱ | |
| درگیری مارژین | ندارد | ۷۳/۸ | ۸۵/۰-۶۲/۷ | ۰/۰۲۵ |
| | دارد | ۴۸/۱ | ۶۱/۶-۳۴/۷ | |




نمودار ۱- مقایسه درصد بیان، شدت بیان و نمره نهایی بیان **NQO1** (مجموع شدت و درصد بیان) در گروه‌های مورد مطالعه. **A)** بیماران مبتلا به **SCC** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN2** (p<۰,۰۰۰۱)†، **CIN1** (p<۰,۰۰۰۱)✦ و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک (p<۰,۰۰۰۱)★ به‌طور معناداری نمره نهایی بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN3** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN2** (p=۰,۰۱۲)✹، **CIN1** (p<۰,۰۰۰۱)✦ و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک (p<۰,۰۰۰۱)♦ به‌طور معناداری نمره نهایی بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN2** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN1** (p=۰/۰۰۲)✵ و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک (p=۰/۰۰۱)‡ به‌طور معناداری نمره نهایی بیان بالاتری داشتند. **B)** بیماران مبتلا به **SCC** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN2** (p<۰/۰۰۰۱)#، **CIN1** (p<۰/۰۰۰۱) ‡ و افراد غیردیسپلاستیک (p<۰/۰۰۰۱)✵ به‌طور معناداری شدت بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN3** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN2** (p<۰/۰۰۰۱)✹، **CIN1** (p<۰/۰۰۰۱)†† و افراد غیردیسپلاستیک (p<۰/۰۰۰۱)✦ به‌طور معناداری شدت بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN2** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN1** (p<۰,۰۰۰۱) † و افراد نرمال (p<۰/۰۰۰۱)♦ به‌طور معناداری نمره نهایی بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN1** نسبت به افراد غیردیسپلاستیک (p=۰/۰۲۵) ★ شدت بیان بالاتری داشتند. **C)** بیماران مبتلا به **SCC** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN3** (p<۰,۰۰۰۱)✹، **CIN2** (p<۰,۰۰۰۱)#، **CIN1** (p<۰,۰۰۰۱)†† و افراد غیردیسپلاستیک (p<۰/۰۰۰۱)♦ به‌طور معناداری شدت بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN3** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN2** (p<۰/۰۰۰۱)✵، **CIN1** (p<۰,۰۰۰۱)‡ و افراد غیردیسپلاستیک (p<۰/۰۰۰۱)✦ به‌طور معناداری شدت بیان بالاتری داشتند. بیماران مبتلا به **CIN2** نسبت به بیماران مبتلا به **CIN1** (p<۰/۰۰۰۱)† و افراد غیردیسپلاستیک (p<۰/۰۰۰۱) ★ به‌طور معناداری نمره نهایی بیان بالاتری داشتند.




نمودار ۲- آنالیز بقاء بیماران مبتلا به بدخیمی دهانه رحم بر اساس متغیرهای مختلف

## بحث

امروزه ارزیابی‌های ژنی و تغییرات بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های سلولی، نقش بسزایی در تشخیص، تعیین پیش‌آگهی و تعیین روند درمان (به‌عنوان پیش‌گویی کننده پاسخ به درمان و یا به‌عنوان هدف درمان) در اغلب بدخیمی‌ها ایفا می‌نمایند (۱۰، ۱۱). یکی از پروتئین‌هایی که در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، پروتئین NQO1 می‌باشد که از یک سو نقش محافظت کننده در برابر مواد سرطان‌زا دارد (۳، ۴، ۱۲) و از سوی دیگر سبب افزایش مقاومت سلول‌های بدخیم در مقابل داروهایی شیمی‌درمانی و افزایش پیشرفت بیماری می‌گردد (۶، ۷، ۱۳، ۱۴)، لذا در این مطالعه میزان بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و ارتباط آن با پروگنوز و فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک بیماری مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 تقریباً در تمام بیماران SCC و CIN3 مشاهده شد که از سایر بیماران با تغییرات دیسپلاستیک خفیف‌تر (CIN2 و CIN1) و افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک بیشتر بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان دیسپلازی در ضایعات CIN، میزان بیان پروتئین NQO1 نیز افزایش یافته و این بیماران نیز نسبت به افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 بالاتری را گزارش کرده‌اند. بین میزان بیان پروتئین NQO1 و نوع تومور، میزان درگیری گره‌های لنفاوی، میزان تمایز تومور و عود ارتباط معناداری وجود نداشت. همچنین بر اساس نتایج آنالیز بقاء، میانه بقاء در بیماران مرحله ۲، مارژین جراحی مثبت و گره‌های لنفاوی درگیر به‌طور معناداری کمتر بود.

نتایج مطالعه حاضر در خصوص فراوانی بالاتر بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و ضایعات پیش‌بدخیم این ناحیه نسبت به افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک همراستا با نتایج مطالعات قبلی انجام شده در بدخیمی دهانه رحم و سایر ارگان‌های بدن به‌خصوص کارسینوم سلول اسکوآموس سر و گردن بوده است. در اولین مطالعه‌ای که در مورد بیان پروتئین NQO1 در کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم انجام شد، هو و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی ژنوم ۵۷۷ بیمار مبتلا نشان دادند که جهش‌های همراه با کسب عملکرد[1] در NQO1 SNP609 با افزایش خطر ابتلاء به سرطان دهانه رحم به‌خصوص در افراد با آلودگی به انواع پرخطر ویروس پاپیلوما انسانی همراه می‌باشد (۹). در مطالعه دیگر ما و همکاران (۲۰۱۴) نیز نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر گزارش گردید و محققین با استفاده از ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و ضایعات پیش بدخیم این ناحیه به‌طور معناداری بالاتر از افراد با لایه پوششی فاقد ضایعه دیسپلاستیک می‌باشد (۶). افزایش غیرطبیعی بیان پروتئین NQO1 در بدخیمی‌های سایر ارگان‌های بدن همچون سرطان معده (۱۴)، سرطان پستان (۱۵)، سرطان سلول کوچک ریه (۷)، کارسینوم سروز تخمدان (۵)، کارسینوم سلول اسکوآموس سر و گردن (۱۶)، آدنوکارسینوم داکتال لوزالمعده (۱۷)، کلانژیوکارسینوما (۸) و سرطان‌های مجاری ادراری (۱۸، ۱۹) گزارش شده است. به‌نظر می‌رسد که افزایش بیان پروتئین NQO1 در بسیاری از کارسینوم‌ها در انسان (به نسبت بافت نرمال) قابل مشاهده می‌باشد و این موضوع، فرصت مناسبی را جهت استفاده از داروهای هدفمند همچون دیکوماروول (۲۰) و یا NQO1 siRNA (۲۱) که سبب مهار آن می‌شوند، فراهم می‌آورد.

همچنین در این مطالعه بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول اسکوآموس دهانه رحم و CIN3 به نسبت بیماران مبتلا به CIN2 بیشتر و در بیماران مبتلا به CIN2 نسبت به بیماران مبتلا به CIN1 و افراد بدون ضایعه دیسپلاستیک افزایش یافته بود. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً بیان تغییر یافته پروتئین NQO1، یک رخداد اولیه در سیر رخداد این بدخیمی می‌باشد؛ به‌خصوص اینکه وجود افزایش بیان پروتئین NQO1 در افراد آلوده به انواع پرخطر

[1] Gain-of-function mutation

ویروس پاپیلوما انسانی با افزایش خطر بدخیمی همراه بوده است (۹). مطالعه ما و همکاران (۲۰۱۴) همراستا با نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش شدت بدخیمی در ضایعات پیش‌بدخیم، بیان پروتئین NQO1 افزایش می‌یابد (۶). نقش تغییرات ژنی NQO1 در سایر سرطان‌ها همچون سرطان ریه نیز نشان داده شده است (۲۲). با توجه به یافته‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر و مطالعات قبلی، این احتمال وجود دارد که بتوان از ارزیابی بیان پروتئین NQO1 به‌عنوان نشانگری در تعیین شدت تغییرات بدخیمی و خطر رخداد بدخیمی در ضایعات پیش‌بدخیم دهانه رحم استفاده نمود. همچنین این موضوع بیانگر نقش احتمالی تغییر بیان پروتئین NQO1 در پیشرفت دیسپلازی نیز می‌باشد. سیر مشابه در خصوص افزایش بروز این مارکر در ضایعات بدخیم به نسبت ضایعات دیسپلاستیک و نقش احتمالی تغییر بیان پروتئین NQO1 در پیشرفت ضایعات پیش بدخیم توسط کویی و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش شده است. در مطالعه آن‌ها خود بیان پروتئین NQO1 در سلول‌های کارسینوم سروز تخمدان بیشتر از تومورهای بوردرلاین سروز و همچنین بیان این پروتئین در این دو گروه بیشتر از تومورهای سروز خوش‌خیم بود (۵). لین و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه دیگر به بررسی نقش تغییرات بیان پروتئین NQO1 در پیشرفت ضایعات دیسپلاستیک در آدنوکارسینوم معده پرداخته و نشان دادند که بیان این پروتئین در آدنوکارسینوم معده بالاتر از ضایعات دیسپلاستیک و بافت نرمال بوده است (۱۴).

در مطالعه حاضر بین بیان پروتئین NQO1 و پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم ارتباط معناداری مشاهده نشد. این در حالی است که در مطالعه ما و همکاران (۲۰۱۴)، در بیماران با افزایش بیان پروتئین NQO1، درگیری گره‌های لنفاوی بیشتر، مرحله بالینی سرطان دهانه رحم پیشرفته‌تر و تمایز سلول‌های بدخیم ضعیف‌تر بود (۶). این نقش پروگنوستیک در سایر بدخیمی‌ها نیز نشان داده شده است. در مطالعه بورارات و همکاران (۲۰۱۲) نیز نتایج نشان‌دهنده پیش‌آگهی ضعیف و بقای کمتر بیماران مبتلا به کلانژیوکارسینوم با بیان بالای پروتئین NQO1 بود (۸). نتایج مشابه در خصوص سرطان پستان در مطالعه فاگرهام و همکاران نیز (۲۰۰۸) گزارش گردید. آن‌ها در مطالعه خود نشان دادند که بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به سرطان پستان با افزایش مقاومت نسبت به استرس اکسیداتیو همراه بوده و این موضوع سبب کاهش معنادار بقای بیماران شده است (۲۳). البته در تفسیر نتایج مطالعه حاضر در خصوص نقش پروگنوستیک بیان پروتئین NQO1 در مبتلایان به سرطان دهانه رحم باید احتیاط نمود؛ چراکه در مطالعه حاضر تمام بیماران به‌جز ۱ بیمار، دارای بیان افزایش یافته این پروتئین بوده‌اند.

این مطالعه جزء اولین مطالعات انجام شده در خصوص بیان پروتئین NQO1 در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم در ایران و جزء معدود مطالعات انجام شده در جهان می‌باشد که به مقایسه بیان آن در بافت غیردیسپلاستیک، CIN1، CIN2، CIN3 و کارسینوم سلول اسکوآموس پرداخته که می‌تواند در فهم روند پاتوژنز این بدخیمی کمک شایانی نماید. این موضوع مهم‌ترین نقطه قوت مطالعه حاضر می‌باشد. البته این مطالعه دارای محدودیت‌ها و نقاط ضعفی نیز بوده است.

تاکنون نقطه برش[1] استاندارد که مورد قبول تمام متخصصین باشد، برای تعیین بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 تعریف نشده، لذا این موضوع یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد. همچنین تعداد محدود بیماران مبتلا به بدخیمی دهانه رحم در این مطالعه، یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های مطالعه حاضر بود که امکان آنالیز بقاء بین بیماران با و بدون بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 را از محققین سلب نمود. یکی دیگر از مهم‌ترین محدودیت‌های حاضر، عدم وجود سامانه‌ای مدون جهت ثبت و پیگیری بیماران مبتلا به ضایعات دهانه رحم به‌خصوص ضایعات پیش‌بدخیم و مرحله ۱ بوده است که آنالیز بقاء در این بیماران را با محدودیت مواجه ساخت.

پیشنهاد می‌گردد در مطالعات مختلف، تعداد بیشتری از بیماران مبتلا به بدخیمی دهانه رحم در مرحله‌های

[1] Cut off point

مختلف وارد شده و با ارزیابی نقطه برش‌های مختلف میزان بیان این پروتئین، نقش دقیق پروگنوستیک این نشانگر را تعیین نمایند. همچنین در صورت تأیید بیان افزایش یافته پروتئین NQO1 در سلول‌های بدخیم کارسینوم اسکوآموس دهانه در مطالعات آتی در بیماران ایرانی، می‌توان نسبت به استفاده درمانی هدف قرار دادن این پروتئین در مطالعات کارآزمایی بالینی فاز ۱ و ۲ اقدام نمود.

## نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش شدت دیسپلازی و پیشرفت به سمت ضایعات بدخیم مهاجم، فراوانی افراد با بیان بالای پروتئین NQO1 نیز افزایش یافته است. این موضوع بیانگر نقش تغییرات ژنی به‌خصوص افزایش بیان پروتئین NQO1 در مراحل اولیه رخداد بدخیمی و پیشرفت آن به سمت کارسینوم مهاجم می‌باشد، لذا می‌توان از این ویژگی در فرآیند تشخیصی به‌خصوص تشخیص زودهنگام ضایعات پیش‌بدخیم پرخطر استفاده نمود. در کنار این موضوع، نتایج این مطالعه نشان داد که بیان پروتئین NQO1 در ضایعات با دیسپلازی شدید بیشتر از دیسپلازی متوسط و در ضایعات با دیسپلازی متوسط بیشتر از ضایعات دیسپلاستیک خفیف می‌باشد که این موضوع نشان‌دهنده نقش احتمالی تغییرات بیان پروتئین NQO1 در پیشرفت و افزایش شدت دیسپلازی این ضایعات دارد. همچنین در این مطالعه میزان بیان پروتئین NQO1 در سلول‌های کارسینوم اسکوآموس و CIN3 به‌طور معناداری بالاتر از بافت غیردیسپلاستیک بود که این موضوع فرصت مناسبی برای استفاده از درمان‌های هدفمند فراهم می‌آورد. در نهایت، نتایج آنالیز بقاء در بیماران مبتلا به سرطان نشان داد که میانه بقاء در بیماران مرحله دو، مارژین جراحی مثبت و گره‌های لنفاوی درگیر به‌طور معناداری کمتر بود.

## تشکر و قدردانی

این پایان‌نامه بر اساس طرح پژوهشی شماره ۹۶۱۶۶۶ مصوب تاریخ ۱۳۹۷/۰۵/۲۴ با عنوان "بررسی بیان ایمونوهیستوشیمی مارکر NQO1 در کارسینوم سلول سنگ‌فرشی سرویکس و ارتباط آن با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک" با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در اجرا این طرح مشارکت داشته‌اند، به‌خصوص از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان قائم و خانم آلاله جهانپور و خانم بهناز برازنده کارشناسان محترم آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان قائم (عج) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## تعارض منافع

در این مطالعه هیچ تضاد منافعی وجود نداشت.

## منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians 2018; 68(6):394-424.
2. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. Chemico-biological interactions 2000; 129(1-2):77-97.
3. Srijiwangsa P, Na-Bangchang K. Roles of NAD (P) H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) on cancer progression and chemoresistance. J. Clin. Exp. Oncol 2017; 6(4):1-6.
4. Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, et al. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. Molecular pharmacology 2004; 65(5):1238-47.
5. Cui X, Li L, Yan G, Meng K, Lin Z, Nan Y, et al. High expression of NQO1 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinoma. BMC cancer 2015; 15(1):1-8.
6. Ma Y, Kong J, Yan G, Ren X, Jin D, Jin T, et al. NQO1 overexpression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. BMC cancer 2014; 14(1):1-9.
7. Cui X, Jin T, Wang X, Jin G, Li Z, Lin L. NAD (P) H: quinone oxidoreductase-1 overexpression predicts poor prognosis in small cell lung cancer. Oncology Reports 2014; 32(6):2589-95.

8. Buranrat B, Chau-in S, Prawan A, Puapairoj A, Zeekpudsa P, Kukongviriyapan V. NQO1 expression correlates with cholangiocarcinoma prognosis. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(Suppl):131-6.
9. Hu X, Zhang Z, Ma D, Huettner PC, Massad LS, Nguyen L, et al. TP53, MDM2, NQO1, and Susceptibility to Cervical CancerTP53, MDM2, NQO1, and Cervical Cancer Susceptibility. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention 2010; 19(3):755-61.
10. Javadinia SA, Shahidsales S, Fanipakdel A, Joudi-Mashhad M, Mehramiz M, Talebian S, et al. Therapeutic potential of targeting the Wnt/β-catenin pathway in the treatment of pancreatic cancer. Journal of Cellular Biochemistry 2019; 120(5):6833-40.
11. Javadinia SA, Shahidsales S, Fanipakdel A, Mostafapour A, Joudi-Mashhad M, Ferns GA, et al. The esophageal cancer and the PI3K/AKT/mTOR signaling regulatory microRNAs: a novel marker for prognosis, and a possible target for immunotherapy. Current Pharmaceutical Design 2018; 24(39):4646-51.
12. Shu KX, Li B, Wu LX. The p53 network: p53 and its downstream genes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2007; 55(1):10-8.
13. Glorieux C, Sandoval JM, Dejeans N, Ameye G, Poirel HA, Verrax J, et al. Overexpression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and genomic gain of the NQO1 locus modulates breast cancer cell sensitivity to quinones. Life sciences 2016; 145:57-65.
14. Lin L, Qin Y, Jin T, Liu S, Zhang S, Shen X, et al. Significance of NQO1 overexpression for prognostic evaluation of gastric adenocarcinoma. Experimental and Molecular Pathology 2014; 96(2):200-5.
15. Yang Y, Zhang Y, Wu Q, Cui X, Lin Z, Liu S, et al. Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014; 33(1):1-9.
16. Yang Y, Jin T, Liu S, Chen L, Lin L, Han H, et al. Prognostic significance of NADPH quinine oxidoreductase 1 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma. Zhonghua Bing li xue za zhi= Chinese Journal of Pathology 2014; 43(7):463-7.
17. Ji M, Jin A, Sun J, Cui X, Yang Y, Chen L, et al. Clinicopathological implications of NQO1 overexpression in the prognosis of pancreatic adenocarcinoma. Oncology Letters 2017; 13(5):2996-3002.
18. NQO1: UROTHELIAL CANCER - Interactive survival scatter ploti & Survival analysisi. Knut & Alice Wallenberg foundation; 2019. Available from: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181019-NQO1/pathology/urothelial+cancer#ihc.
19. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. Science 2017; 357(6352):eaan2507.
20. Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, et al. Dicumarol inhibition of NADPH: quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. Cancer research 2003; 63(17):5513-20.
21. Ahn KS, Sethi G, Jain AK, Jaiswal AK, Aggarwal BB. Genetic deletion of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 abrogates activation of nuclear factor-κB, IκBα kinase, c-Jun N-terminal kinase, Akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. Journal of Biological Chemistry 2006; 281(29):19798-808.
22. Kim JH, Cho SH, Hong YC, Kim H, Lee KY, Choe KH, et al. P2-016: Interactive effect of smoking and NQO1 for lung cancer risk. Journal of Thoracic Oncology 2007; 2(8):S488.
23. Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, et al. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 NQO1* 2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. Nature genetics 2008; 40(7):844-53.