زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۲، صفحات ۶۸-۵۹

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات سطح بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در نمونه بافت هایپرپلازی آندومتر در مقایسه با بافت نرمال

پروین قادری[۱]، سودابه فلاح[۲*]، حمیدرضا خالدی[۳]، افسانه طهرانیان[٤]، فرشته رحمتی[۱]، شهرزاد شیخ حسنی[٤]

۱- گروه بیوشیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی کشاورزی، واحد یادگار امام خمینی(ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

٤- گروه آموزشی بیماریهای زنان و زایمان دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: fallah.s@iums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲٤

DOI: 10.22034/ascij.2023.1976006.1451

چکیده

هایپرپلازی آندومتر تکثیر نامنظم غدد آندومتر و افزایش نسبت غده به استروما در مقایسه با آندومتر پرولیفراتیو نرمال است. هایپرپلازی آندومتر یکی از پیش‌سازهای سرطان آندومتر است که از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات سطح بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در نمونه بافت هایپرپلازی آندومتر در مقایسه با نمونه بافت نرمال انجام شد. در این مطالعه مورد – شاهدی نمونه‌های هایپرپلازی همراه با بافت حاشیه نرمال از آندومتر رحم زنانی که با خونریزی غیرعادی رحمی و یا افزایش ضخامت آندومتر به درمانگاه زنان بیمارستان آرش مراجعه کردند گرفته شد. نمونه بافت نرمال حاشیه ای و نمونه هایپرپلازی به ترتیب به عنوان شاهد و مورد در نظر گرفته شدند. سطح نسبی بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip با روش Real time PCR پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA سنجیده شد و در ادامه تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش با روش $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد آنالیز قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون تی تست مستقل انجام گرفت. سطح نسبی بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در نمونه بافت هایپرپلازی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری نداشت ($p > ۰/۰۵$). اگر چه نتایج برخی مطالعات حاکی از آن است که سطح بیان ژن‌های FOXO1 و P27KIP در در سرطان آندومتر می تواند دچار تغییر گردد، اما نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که بر خلاف انتظار سطح نسبی بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در بافت هایپرپلازی در مقایسه با بافت نرمال دچار تغییر معناداری نمی‌گردد.

کلیدواژه: هایپرپلازی، آندومتر، FOXO1، P27 kip

مقدمه

هایپرپلازی آندومتر تکثیر غیر تهاجمی و غیرطبیعی پوشش آندومتر رحم است که به عنوان پیش‌ساز سرطان آندومتر می‌باشد که ششمین سرطان شایع در بین زنان در سراسر جهان است (۲۰). هیپرپلازی آندومتر (EH) یک آسیب‌شناسی رحمی است که طیفی از تغییرات مورفولوژیکی آندومتر را نشان می‌دهد و عمدتاً با افزایش نسبت غدد آندومتریال به استروما مشخص می‌شود و با خطر پیشرفت به

سرطان اندومتر همراه است (۸). عوامل خطر برای ایجاد هایپرپلازی ارتباط نزدیکی با عوامل خطر شناخته شده با سرطان آندومتر دارد (۱۳). هایپرپلازی آندومتر نقش مهمی در پیشرفت و تبدیل به سرطان آندومتر دارد. یکی از عوامل مهم ایجاد هایپرپلازی و سرطان آندومتر عدم تعادل مزمن استروژن و پروژسترون به نفع استروژن و قرار گرفتن در معرض استروژن بیش از حد بدون اثر آشکار پروژستین درون زا یا اگزوژن می‌باشد (۱۴). علاوه بر این، عوامل محیطی و ژنتیکی نیز عوامل مهم دیگری برای ایجاد سرطان و هایپرپلازی محسوب می‌شوند. بر این اساس اختلالات ژنتیکی که باعث افزایش فعالیت ژن‌های آنکوژن و خاموش یا مهار ژن‌های سرکوب‌کننده توموری که نقش اساسی در کنترل فرایندهای اساسی سلولی نظیر تقسیم، تمایز و آپوپتوز نقش دارند باعث افزایش ریسک ابتلا به هایپرپلازی و متعاقبا تبدیل به سرطان می‌گردند. فاکتور رونویسی سرکوبگر FOXO1 (Forkhead box transcription factor) بعنوان تنظیم‌کننده منفی مسیر سیگنالیگ PI3K/AKT بعنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی، سیکل سلولی، هموستاز متابولیکی، ایمنی، اتوفاژی و اپوپتوز می‌باشد و دارای نقش سرکوبگری آن در بروزسرطان می‌باشد. افزایش بیان FOXO1 منجر به توقف چرخه سلولی، تنظیم کننده‌های ایمنی، القای توقف چرخه سلولی سرطان و سرکوب مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی نقش عمده‌ای دارد (۱۶، ۲۱). مشخص شده است که FOXO1 در تنظیم پروتئین‌های kipP27 Bim و Bcl2 نیز نقش دارند (۲). مطالعات نشان داده‌اند که پروموترژن P27، توسط FOXO1 و FOXO3 فعال می‌شود و بیان آن افزایش می‌یابد (۹). غیرفعال شدن FOXO1 از طریق فسفوریلاسیون بطور منفی توسط نسبت Akt1-p/ Akt ۱ تنظیم می‌شود که سبب خروج آن از هسته و قرارگیری در سیتوزول می گردد که در آنجا تجزیه و تخریب میگردد (۱۱). بطور برعکس، فعال شدن AMPK منجر به قرارگیری FOXO1 در هسته و فعالسازی آن می‌شود (۱۸).

p27kip1 (p27) یک عضوی از خانواده مهار کننده کیناز وابسته به سیکلین (CDKI) است که چرخه سلولی را از مرحله G1 به S را به وسیله باند به Cyclin D1- CDK و CyclinE-CDK2 مهار می‌کند (۱). بطوریکه در مطالعه‌ای مشخص شده که فرم موتانت FOXO4 سبب فعال شدن p27 شده که بعنوان یک عامل ضدسرطان برعلیه سلول‌های سرطانی با بیان بالای HER2 عمل می‌کند (۵). بیان p27 توسط مهار تماس سلول و فاکتورهای رشد اختصاصی مانند factorβ (TGF)- β transforming growth تنظیم می‌شود. p27 یک سرکوبگر تومور پر توان ژن، تنظیم کننده مقاومت دارویی در تومورهای جامد و پروموتر آپوپتوزی است و بعنوان یک گارد محافظتی علیه آسیب‌های التهابی عمل می‌کند و نقش مهمی در تمایز سلولی دارد. همچنین p27 به عنوان یک فاکتور تشخیصی مستقل در سرطان های انسانی مانند سینه، کولون و آدنوکارسینومای پروستات تعیین شده است و بررسی سطح آن در این سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶). p27 یک سرکوبگر تومور پر توان ژن، تنظیم کننده مقاومت دارویی در تومورهای جامد و پروموتر آپوپتوزی است و بعنوان یک گارد محافظتی علیه آسیب‌های التهابی عمل می‌کند و نقش مهمی در تمایز سلولی دارد (۱). نتایج پژوهش‌ها نشان داد که بیان کم یا عدم بیان پروتئین P27Kip1 و بیان بیش از حد P53 با پیشرفت تومور و پیش آگهی ضعیف در چندین نوع کانسر مثل کارسینوم کبد، پروستات، حنجره، کولون و مری درارتباط است (۶). کاهش سطح p27Kip1 در سرطان های اولیه با کاهش بقای بیمار ارتباط زیادی دارد. P27Kip1بر پیشرفت چرخه سلولی از طریق تعامل با

کمپلکس‌های سیکلین-CDK تأثیر می‌گذارد و ممکن است به نقش آن به عنوان یک سرکوب‌کننده تومور مرتبط‌تر باشد (٦). بررسی پیسینه‌های تحقیقاتی نشانگر آن است که مطالعات در خصوص ژن‌های دخیل در ایجاد هایپرپلازی، به ویژه ژن‌های FOXO1 و P27 Kip، بسیار محدود است. از طرفی بررسی نقش و ارتباط ژن‌های FOXO1 و P27 Kip با هایپرپلازی می‌تواند در شناخت ما از عوامل ژنتیکی به وجود آورنده هایپرپلازی که خود زمینه‌ساز سرطان آندومتر می‌باشد، کمک موثری ارایه دهد. در واقع بررسی ارتباط یا عدم ارتباط ژن‌های فوق‌الذکر با هایپرپلازی، از نظر شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد هایپرپلازی دارای اهمیت می‌باشد. بر این مبنا، مطالعه حاضر به بررسی تغییرات سطح نسبی بیان ژن‌های FOXO1 و Kip P 27 در نمونه بافت هایپرپلازی آندومتر در مقایسه با نمونه بافت نرمال پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مجوز این پژوهش از کمیته اخلاق در دانشگاه علوم پزشکی ایران با شناسه .R.IUMS.FMD.REC.1401. 169 اخذ گردید. قبل از نمونه‌گیری رضایت نامه کتبی از تمام بیماران دریافت گردید.

جمع‌آوری نمونه و نگهداری: در این مطالعه مورد-شاهدی نمونه‌های هایپرپلازی همراه با بافت حاشیه‌ای نرمال از آندومتر رحم زنانی که با خونریزی غیر عادی رحمی و یا افزایش ضخامت آندومتر به درمانگاه زنان بیمارستان آرش مراجعه کردند گرفته که توسط پاتولوژیک تشخیص هایپرپلازی آندومتر داده شد. زنان مبتلا به هایپرپلازی آندومتر با و بدون آتیپی که تحت عمل جراحی هیسترکتومی قرارگرفتند. معیار خروج نمونه‌ها از مطالعه شامل داشتن کنتراندیکاسیون هیسترکتومی، سابقه مصرف داروهای استروئیدی از جمله استروژن، و سابقه بیماری‌های زمینه‌ای از قبیل بیماری‌های قلبی عروقی، کلیه ... بود. پس از انتخاب بیماران مورد مطالعه توسط پزشک معالج، تعیین ضخامت آندومتر با استفاده از سونوگرافی واژینال یا ابدومینال انجام شد و بافت توموری آندومتر و بافت سالم کنار تومور توسط جراح برداشته و توسط پاتولوژیست با انجام تست‌های اختصاصی هیستولوژیک و پاتولوژیک وجود هایپرپلازیای آندومتر مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌ها در تانک ازت قرار داده و در ۷۰ -درجه فریز و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در این مطالعه تمام دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از نمونه‌های انسانی که نیاز بود رعایت گردید. نمونه‌ها مورد مطالعه در دو گروه کنترل و گروه با هایپرپلازی آندومتر (با آتیپی یا بدون آتیپی) که در هر گروه ۵ نمونه قرار گرفت تقسیم بندی شدند. قبل از شروع آزمایش نمونه های فریز شده به وسیله هاون چینی استریل کوبیده شدن و توده سلولی جدا شدند و تا زمان استفاده از سلول‌ها در فریز ۷۰ -درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج RNA: در این مطالعه به منظور بررسی سطح بیان ژن‌های FOXO1 و P27kip در گروه کنترل و گروه بیمار استخراج RNA کل سلولی مطابق دستورالعمل کیت اختصاصی (یکتا تجهیز، ایران) صورت پذیرفت. در ادامه جهت بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز استفاده شد.

تعیین غلظت RNA: اسیدهای نوکلئیک RNA و DNA به علت حضور بازهای پورینی و پیریمیدینی با ساختاری حلقوی دارای پیوند دوگانه و خاصیت رزونانس، دارای قابلیت جذب اشعه ماورابنفش در طول موج ۲٦۰ nm هستند. بر این اساس، غلظت نمونه‌های RNA استخراج شده توسط دستگاه

نانودراپ به روش اسپکتروفوتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی کیفیت RNA: علاوه بر قرائت جذب در در طول موج ۲۶۰ nm و تعیین غلظت RNA، میزان جذب در طول موج ۲۸۰ nm نیز به منظور بررسی میزان خلوص RNA و سطح آلودگی به پروتئین استخراج شده، مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه پروتئین‌ها حاوی اسیدهای آروماتیک ، قادر به جذب نورUV در طول موج ۲۸۰ nm هستند، نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ nm نشان‌دهنده میزان خلوص RNA یا آلودگی ان به سایر مواد است. عدد ۲ برای این نسبت، به عنوان میزان قابل قبول برای خلوص RNA در نظر گرفته شد.

سنتز cDNA: استخراج cDNA از روی توتال RNA با استفاده از کیت مخصوص (یکتا تجهیز، ایران) و طبق دستورالعمل سنتز انجام گرفت. RNA به همراه بافر، آنزیم RT، پرایمر اولیگو dT و رندوم هگزامر اضافه شد و در ادامه با آب تیمار شده با دی اتیل پیرو کربنات‌دار به حجم نهایی رسانده شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و به منظور غیرفعال کردن آنزیم RT به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه در دستگاه قرار گرفتند.

طراحی پرایمرهای ژن‌های FOXO1 و P27kip و GAPDH: پرایمرهای ژن‌های FOXO1 و P27kip و GAPDH (ژن کنترل داخلی) با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شدند و با استفاده از پایگاه داده‌ای NCBIو Blast گردید (جدول ۱).

واکنش Real-Time PCR: ارزیابی بیان ژن با روش سایبرگرین به وسیله دستگاه ترمال سایکلرPCR (مدل T100 کمپانی BIORAD آمریکا) انجام گرفت. واکنش برای هرکدام از ژن‌های FOXO1 و P27kip و ژن کنترل داخلی GAPDH در محلول سایبر گرین (SYBR-Green PCR Master) و پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱) و cDNA رقیق شده که در نهایت با آب عاری از نوکلئاز به حجم مورد نظر رسید، صورت گرفت. برنامه دمایی به صورت زیر تنظیم شد: در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه سپس یک برنامه واکنش تکثیر برای ۴۰ سیکل تکرار شد که هر سیکل شامل ۵ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و دمای اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد ۲۰ ثانیه‌و دمای طویل‌سازی قطعات ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. مرحله ذوب برای محصولات در دمای ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتیگراد انجام شد. با روش $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش مورد آنالیز قرار گرفت.

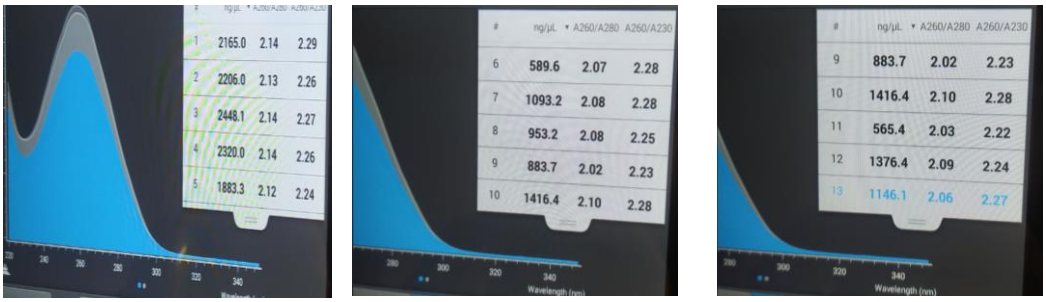
آنالیز آماری: بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم-افزار SPSS نسخه ۲۲ آنالیز شدند. وضعیت نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف بررسی شد و با توجه به توزیع نرمال، از آزمون تی تست مستقل جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. اختلاف بین گروه‌ها در سطح$\alpha <$ ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول۱- پرایمرهای ژنFOXO1, P27kip و GAPDH

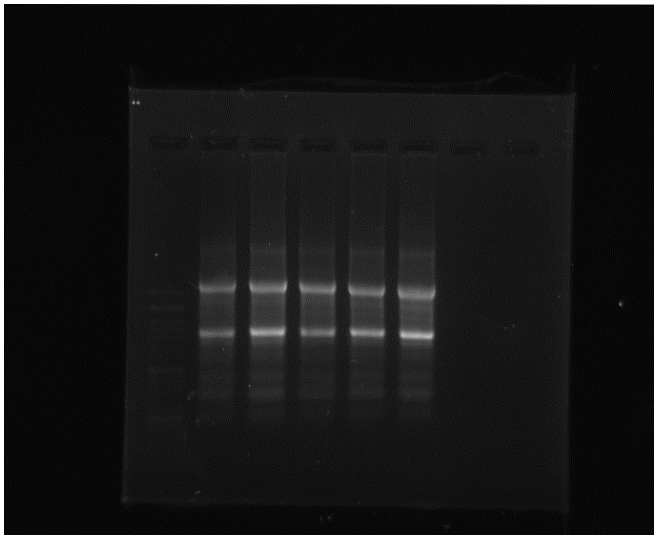
Gene	Primer
FOXO1	F:5′CAAGGATAAGGGTGACAGCA3′ R: 5′TGCAGGCCATTTGGAAAACTG3′
P27kip	F: 5′TCCTTTGGTGGGCACCTAAGACCTG3′ R: 5′ TGATGGTTGAGGTCGTTCCTTGATG 3′
GAPDH	F: 5′CCAACGTGTCAGTGGTGGA 3′ R: 5′GTCAAAGGTGGAGGAGTGGG 3′

نتایج

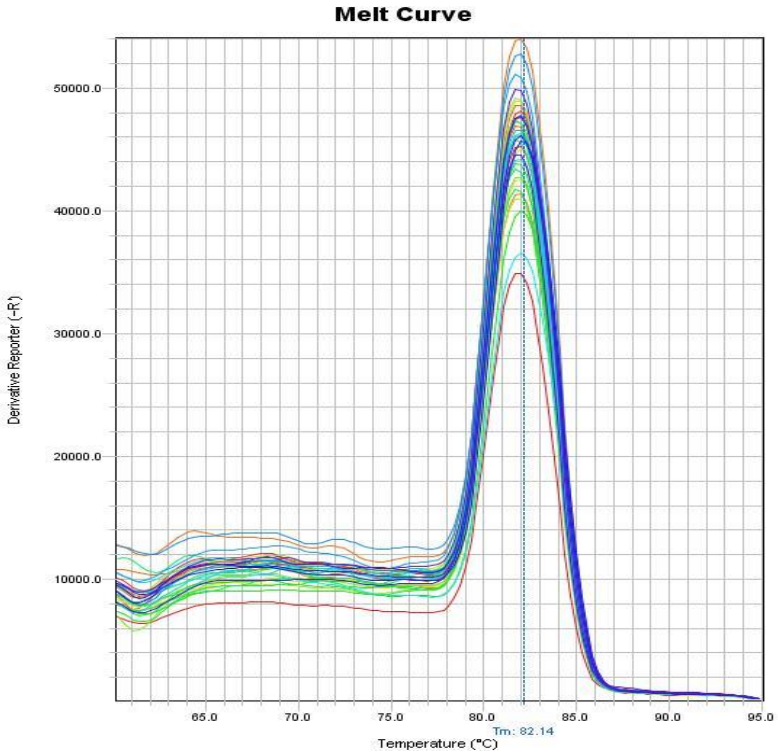
همانطور که در شکل‌های ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود منحنی‌های جذب و نتایج الکتروفورز ژل اگارز مربوط به توتال RNA استخراج شده از میزان خلوص و کیفیت قابل قبول برخوردار است. تک کروی بودن منحنی‌های ملتینگ ژن‌های مورد مطالعه ما نشان‌دهنده چسبندگی کامل پرایمرها به ناحیه ژن‌های مورد مطالعه ما می‌باشد که در نمودار ۱ قابل مشاهده است. مطابق نمودار ٤ ملاحظه می‌شود که اختلاف بین سطح بیان نسبی ژن‌های FOXO1 و 27kip در گروه هایپرپلازی در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشد (p >۰/۰۵).



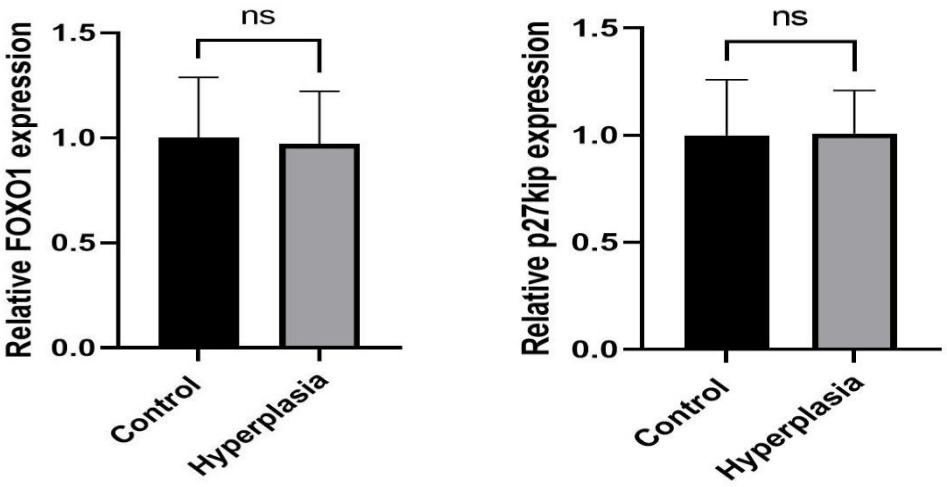
شکل ۱- منحنی‌های جذب نوری توتال RNA



شکل ۲- الکتروفورز ژل اگارز توتال RNA



نمودار ۱- منحنی ذوب ژن‌های مورد مطالعه



نمودار ۲- مقایسه بیان نسبی ژن هایFOXO1 و P27 kip در دو گروه بیمار و گروه کنترل . ns=P>0.05

بحث

همانطور که اشاره شد هایپرپلازی آندومتر می‌تواند پیش‌ساز ایجاد سرطان آندومتر باشد که از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین زنان می‌باشد. یکی از عوامل ایجاد هایپرپلازی و متعاقبا سرطان اندمتر اختلالات ژنتیکی در سطح ژنهای دخیل در رشد و تکثیر اندومتر می-باشد. با توجه به اطلاعات بسیار ناچیز در دسترس در این خصوص، در مطالعه حاضر، تغییرات بیان ژن‌های FOXO1 و P27kip در نمونه بافت هایپرپلازی آندومتر در مقایسه با بافت کنترل پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان دادند که تفاوت معناداری در بیان

ژن‌های FOXO1 و P27kip در بیماران هایپربلازی نسبت به گروه افراد سالم وجود ندارد. مطالعات اپید میولوژی نشان می‌دهد که ریسک بروز عارضه هیپرپلازی آندومتر تقریباً سه برابر بیشتر از سرطان آندومتر است و اشکال غیرعادی خاصی از هیپرپلازی آندومتر به عنوان نشان‌دهنده ضایعات پیش برنده مستقیم به سمت و سوی سرطان آندومتر در نظر گرفته می‌شود (۷) و از این نظر مطالعه عوامل ژنتیکی دخیل در هایپریلازی آندومتر به دلیل امکان تبدیل آن به سرطان آندومتر بسیار مهم است.

مطالعات پیشین، تغییراتی را در بیان ژن‌های سرکوبگر تومور در بسیاری از سرطان‌ها را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای کاهش بیان پروتیین و هایپرمتیلاسیون پروموتر ژنFOXO1 در سرطان پستان نشان داده شده است (۵). نتایج برخی از مطالعات نشان‌دهنده کاهش بیان ژن‌های p27KIP1 و p57KIP2 در سلول‌های سرطان ریه می‌باشد (٦). همچنین در مطالعه‌ای کاهش بیان ژن p27Kip در سلول‌های سرطان پستان نشان نیز داده شده است (١٤). نتایج مطالعه ایمونوهیستوشیمی بر روی ٤٩ بافت تومور آندومتر، کاهش بیان FOXO1 را در مقایسه با بیان آندومتر طبیعی را نشان داده‌اند (۱۵). بسیاری از مطالعات بر روی سرطان رحم کاهش بیان FOXO1 در سرطان رحم در مقایسه با نئوپلازی داخل اپیتلیالی دهانه رحم و سرویکس نرمال را نشان می‌دهند (۲۰). مطالعات نشان می‌دهند که کاهش بیان FOXO1 در سرطان آندومتر ممکن است با وساطت برخی از miRها صورت می‌گیرد (۱۱). همچنین کاهش بیان سطح FOXO1 می‌تواند نتیجه کاهش قابل توجه در فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) باشد. (۲۳). مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که کاهش FOXO1، هموستاز آندومتر را مختل نموده، تکثیر کنترل نشده سلولی را ترویج داده و حساسیت به ضایعات ژنوتوکسیک را افزایش می‌دهد (٤).

علیرغم نتایج بدست آمده در مطالعه ما، نتایج پژوهشی که بر روی رده سلولی سرطان آندومتر انجام گرفته است سطح پایین بیان FOXO1 را نشان داده است (۳). گرچه این مطالعه بر روی بافت سرطانی آندومتر انجام شده است و مطالعه حاضر بر روی بافت هایپرپلازی آندومتر صورت گرفته است. از سویی، بررسی های ژنتیکی نشانگر آن است که خاموش کردن ژن SMC4 تکثیر سلولی را مهار کرده و آپوپتوز را در بافت آندومتر از طریق تنظیم فعالیت FoxO1تسهیل می‌نماید (۱۸).

همچنین در مطالعه‌ای بر روی سرطان پستان نشان داده که بیان p27 (kiP1) در سلول‌های سرطان پستان از تهاجم سلول‌های سرطان سینه جلوگیری کرده و بیان ژن p27(kip)(1) سبب سرکوب مهاجرت سلولی می‌شود (۱۰). از سوی دیگر، افزایش بیان ژن‌های p21، p27 و p57 می‌تواند سبب آپوپتوز سلولی و مهار رشد سلولی در سرطان روده بزرگ گردد (١٦).

تا حد اطلاع نگارندگان این مقاله، این تحقیق برای اولین بار نشان می‌دهد که تفاوت معناداری در بیان ژن‌های FOXO1 و P27kip در بیماران هایپربلازی آندومتر نسبت به گروه افراد سالم وجود ندارد و این امر از نظر شناخت نقش عوامل ژنتیکی موثر یا غیر موثر در پیدایش هایپرپلازی دارای اهمیت ویژه ای است. اگرچه این مطالعه از نظر تعداد نمونه‌ها دارای محدودیت می‌باشد.

بدیهی است برای درک بیشتر از نقش این ژن‌ها در شکل‌گیری هایپر پلازی نیاز مند اولا تعداد نمونه‌های بیشترو ثانیا مطالعات گسترده‌تری می‌باشد که در اینده باید به انها پرداخته شود تا بتوان ارزیابی‌های دقیقتری را ارایه نماید.

نتیجه‌گیری

اگرچه مطالعات مبنی بر بررسی بیان ژن‌های سرکوبگر توموری در هایپرپلازی آندومتر بسیار محدود است و نتایج برخی مطالعات مختلف حاکی از آن است که ژن های FOXO1 و P27KIP در تنظیم آپوپتوز و متابولیسم سلولی نقش مهمی دارند و در اکثر سرطان‌های مختلف و همچنین سرطان آندومتر بیان آنها دچار اختلال می‌گردد، اما نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که بر خلاف انتظار، بین سطح نسبی بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در نمونه بافت هایپرپلازی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نگردید . مطالعات بیشتر با تعداد نمونه بیشتر می‌تواند بررسی دقیقتری در خصوی نحوه تغییرات بیان ژن‌های FOXO1 و P27 kip در نمونه بافت هایپرپلازی ارایه دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتنج از پایان نامه دکترای مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می‌باشد. از تمامی کسانی که در این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Burke W.M., Orr J., Leitao M., Salom E., Gehrig P., Olawaiye A.B., Brewer M., Boruta D., Herzog T.J., Shahin F.A., 2014. SGO Clinical Practice Endometrial Cancer Working Group. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II. *Gynecologic Oncology*, 134(2):393-402.

2. Fader A.N., Arriba L.N., Frasure H.E., von Gruenigen V.E.J.G. 2009. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecologic Oncology*, 114(1):121-127.

3. Fang Q., Sang L., Du S. 2018. Long noncoding RNA LINC00261 regulates endometrial carcinoma progression by modulating miRNA/FOXO1 expression. *Cell Biochemistry and Function*, 36(6):323-30.

4. Goto T., Takano M., Albergaria A., Briese J., Pomeranz K.M., Cloke B., Fusi L., Feroze-Zaidi F., Maywald N., Sajin M., Dina R.E. 2008. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene*, 27(1):9-19.

5. Khan M.A., Massey S., Ahmad I., Akhter N., Habib M., Mustafa S., Deo S.V., Husain S.A. 2022. FOXO1 gene downregulation and promoter methylation exhibits significant correlation with clinical parameters in Indian breast cancer patients. *Frontiers in Genetics*, 13:842943.

6. Korani M., Fallah S., Tehranian A., Nourbakhsh M., Samadikuchaksaraei A., Pour M.S., Maleki J. 2013. The evaluation of the FOXO1, KLF9 and YT521 genes expression in human endometrial cancer. *Clinical Lab*, 59(5-6):483-489.

7. Kousteni S. 2012. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone*, 50(2):437-443

8. Kurman R.J., Ellenson L.H., Ronnett B.M. 2011. Blaustein's pathology of the female genital tract. *New York*: Springer.

9. Lees S.J., Childs T.E., Booth F.W. 2008. Age-dependent FOXO regulation of p27Kip1 expression via a conserved binding motif in rat muscle precursor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(5):C1238-46.

10. Li X., Song C., Wang K., Li N., Sun S., Li N., Zhao Z., Li M. 2019. Prognostic significance of LAPTM4B and p27kip1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Biomarkers*, 25(1):19-27.

11.Myatt S.S., Wang J., Monteiro L.J., Christian M., Ho K.K., Fusi .L, Dina R.E., Brosens J.J., Ghaem-Maghami S., Lam E.W. 2010. Repression of FOXO1 expression by microRNAs in endometrial cancer. *Cancer Research*, 70(1):367.

12. Matsuzaki H., Daitoku H., Hatta M., Tanaka K., Fukamizu A. 2003. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20):11285.

13. Ozdegirmenci O., Kayikcioglu F., Bozkurt U., Akgul M.A., Haberal A.J.G., 2011. Comparison of the efficacy of three progestins in the treatment of simple endometrial hyperplasia without atypia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 72(1):10-14.

14. Reinbolt R.E., Hays J.F. 2013. The role of PARP inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. *Frontiers in Oncology*, 3:237.

15. Sanderson P.A., Critchley H.O., Williams A.R., Arends M.J., Saunders P.T. 2017. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Human Reproduction Update*, 23(2):232-243.

16. Sanaei M., Kavoosi F. 2019. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine in comparison to valproic acid and trichostatin A on histone deacetylase 1, DNA methyltransferase 1, and CIP/KIP family (p21, p27, and p57) genes expression, cell growth inhibition, and apoptosis induction in colon cancer SW480 cell line. *Advanced Biomedical Research*. 2019:8.

17. Xing Y.Q., Li A., Yang Y., Li X.X., Zhang L.N., Guo H. 2018. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sciences*, 193:124-131.

18. Yan Y., Liu C., Zhang J., Li W., Yin X., Dong L., Pang S., Li X. 2021. SMC4 knockdown inhibits malignant biological behaviors of endometrial cancer cells by regulation of FoxO1 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 712:109026.

19. Yun H., Park S., Kim M.J., Yang W.K., Im D.U., Yang K.R., Hong J., Choe W., Kang I., Kim S.S., Ha J. 2014. AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *The FEBS Journal*, 281(19):4421-4438.

20. Zhang B., Gui L.S., Zhao X.L., Zhu L.L., Li Q.W. 2015. FOXO1 is a tumor suppressor in cervical cancer. *Genetics and Molecular Research*, 14(2):6605-6016.

21. Zhang S., Gong T.T., Liu F.H., Jiang Y.T., Sun H., Ma X.X., Zhao Y.H., Wu Q.J. 2019. Global, regional, and national burden of endometrial cancer, 1990–-2017: results from the global burden of disease study, 2017. *Frontiers in Oncology*, 9:1440.

22. Zhang W., Duan N., Song T., Li Z., Zhang C., Chen X. 2017. The emerging roles of forkhead box (FOX) proteins in osteosarcoma. *Journal of Cancer*, 8(9):1619.

23. Zou J., Hong L., Luo C., Li Z., Zhu Y., Huang T., Zhang Y., Yuan H., Hu Y., Wen T., Zhuang W. 2016. Metformin inhibits estrogen-dependent endometrial cancer cell growth by activating the AMPK–FOXO 1 signal pathway. *Cancer Science*, 107(12):1806-1817.

Investigating the Changes in Expression Level of FOXO1 and P27 Kip Genes in Endometrial Hyperplasia Tissue Samples Compared to Normal Tissue Sample

Parveen Qadri[1], Soudabe Fallah[2*], Hamidreza Khaledi[3], Afshaneh Tehranian[4], Fereshteh Rahmati[1], Shahrazad Sheikh Hosni[4]

1- Department of Biochemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Agricultural Engineering, Yadgar Imam Khomeini (RA) Shahrari Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Endometrial hyperplasia is the irregular proliferation of endometrial glands and an increase in the ratio of gland to stroma compared to normal proliferative endometrium. Endometrial hyperplasia is one of the precursors of endometrial cancer, which is one of the most common cancers among women. The present study was conducted with the aim of investigating changes in the expression level of FOXO1 and P27 kip genes in endometrial hyperplasia tissue samples compared to normal tissue sample. In this case-control study, samples of hyperplasia with normal marginal tissue were taken from the uterine endometrium of women who referred to the women's clinic of Arash Hospital with abnormal uterine bleeding or increased endometrial thickness. Marginal normal tissue sample and hyperplasia sample were considered as control and case, respectively. The relative expression level of FOXO1 and P27 kip genes was measured by real time PCR method after total RNA extraction and cDNA synthesis, and then the data obtained from the reaction was analyzed by $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Data were analyzed using independent t-test. The relative expression level of FOXO1 and P27 kip genes in the hyperplasia tissue sample was not significantly different compared to the control group ($P>0.05$). Although the results of some studies indicate that the expression level of FOXO1 and P27KIP genes can be changed in endometrial cancer, the results of the present study showed that, contrary to expectations, there is no significant change in relative expression level of FOXO1 and P27KIP genes in hyperplasia tissue compared to normal tissue.

Keywords: Hyperplasia, Endometrium, FOXO1, P27 kip