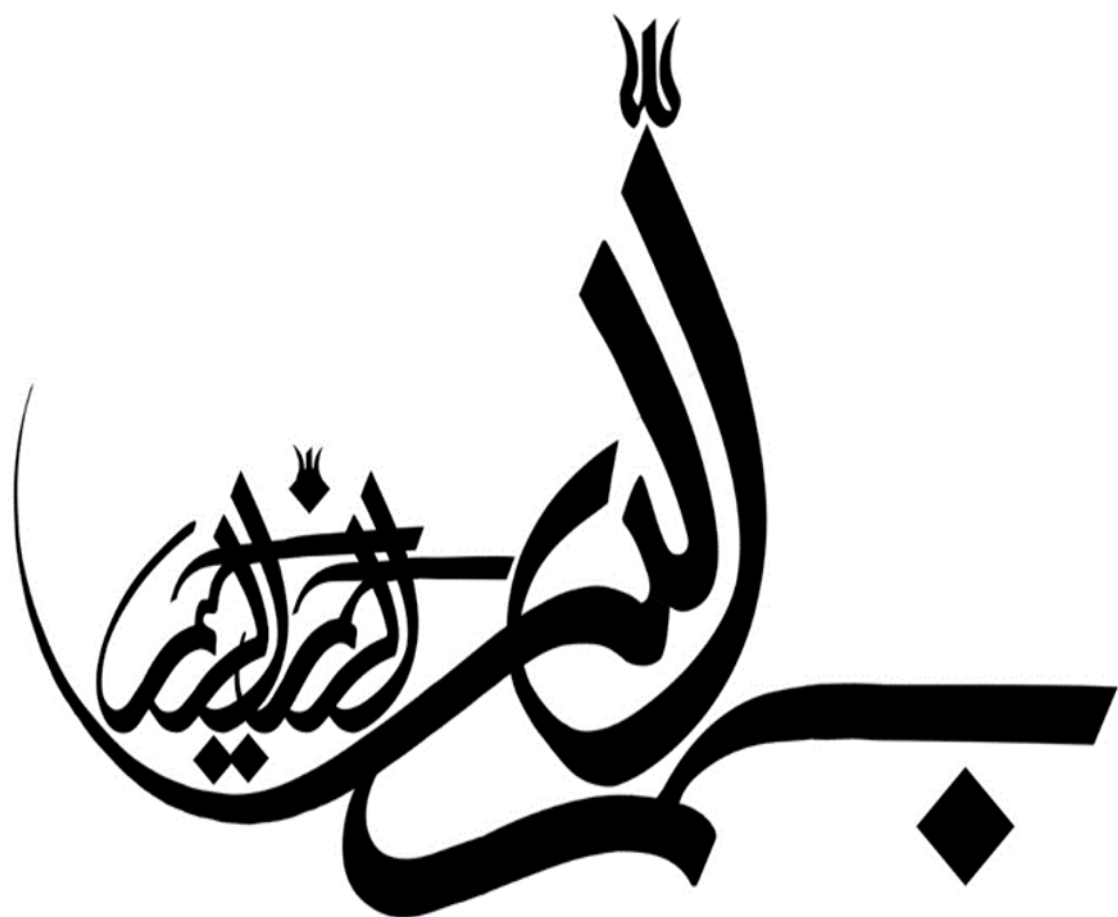


با افتخار تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم، که واژه واژه این پایان نامه، ثمره صبر، ایثار و باور همیشگی آن ها به من است. بی شک بدون حمایت های بی دریغ شما، اتمام این راه ممکن نبود.

و به تمامی دختران و مادران پاک و فداکار وطنم، که بخش بزرگی از دغدغه های این پژوهش، حفظ سلامت و شادابی آن هاست. با آرزوی فرداهایی روشن تر، سرشار از آگاهی و به دور از رنج بیماری سرطان دهانه رحم.





دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتراي حرفه ای رشته پزشکی

بررسی اثر هم افزایی سیسی پلاتین و ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین و آترواستاتین در جهت القای مرگ سلولی

در سلول های سرطان دهانه رحم

نگارش: مارال محمودی

اساتید راهنما: دکتر زهرا قوامی – دکتر الهام صفرزاده

شماره پایان نامه: IR.ARUMS.MEDICINE.REC.1403.097

فهرست مطالب

بررسی اثر هم افزایی سیس پلاتین و ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین و آترواستاتین در جهت القای مرگ سلولی در سلول

۱. های سرطان دهانه رحم

۱. چکیده:

۳. فصل اول: مقدمه

۴. ۱-۱: مقدمه

۴. ۲-۱: بیان مسأله

۶. ۳-۱: اهداف و فرضیات طرح

۶. ۱-۳-۱: اهداف کلی:

۶. ۲-۳-۱: اهداف اختصاصی:

۷. ۳-۳-۱: اهداف کاربردی:

۸. ۴-۱: فرضیات یا سوالات طرح

۹. ۵-۱: تعاریف واژه اختصاصی

۱۱. فصل دوم: بررسی متون

۱۲. ۱-۲: مبانی نظری

۱۲. ۱-۱-۲، سرطان دهانه رحم

۱۳. ۱-۱-۲-۱، علت شناسی

۱۴. ۲-۱-۲-۱، اپیدمیولوژی

۱۴. ۳-۱-۲-۱، پاتوفیزیولوژی

۱۵. ۴-۱-۲-۱، هیستوپاتولوژی

۱۶. ۵-۱-۲-۱، شرح حال و معاینه فیزیکی

۱۷. ۶-۱-۲-۱، ارزیابی و تشخیص

۱۸. ۷-۱-۲-۱، درمان و مدیریت

۱۹. ۸-۱-۲-۱، تشخیص افتراقی

۴۲. ۹-۱-۲-۱، مرحله بندی

۴۳	 پیش‌آگهی ۱۰-۱-۱-۲
۴۵	 سیس‌پلاتین ۲-۱-۲
۴۵	 موارد مصرف در بزرگسالان ۱-۲-۱-۲
۴۷	 موارد مصرف در کودکان ۲-۲-۱-۲
۴۷	 مکانیسم اثر ۳-۲-۱-۲
۴۸	 استاتین‌ها ۳-۱-۲
۴۷	 مکانیسم اثر ۱-۳-۱-۲
۴۹	 فارماکوکینتیک ۲-۳-۱-۲
۵۰	 ایرینوتکان ۴-۱-۲
۵۰	 مکانیسم اثر ۱-۴-۱-۲
۵۱	 بررسی متون ۲-۲
۵۴	 فصل سوم: مواد و روش کار
۵۵	 نوع پژوهش ۱-۳
Error! Bookmark not defined.	 ۲-۳: جامعه آماری، روش نمونه‌گیری، حجم نمونه
Error! Bookmark not defined.	 ۳-۳: روش جمع‌آوری اطلاعات
۵۹	 روش اجرای طرح ۴-۳
۵۹	 کشت سلولی ۱-۴-۳
۵۹	 مواد
۶۲	 روش انجام کار
۶۴	 ۲-۴-۳: شمارش سلولی و سنجش MTT
۶۴	 روش بررسی زنده بودن و شمارش تعداد سلول‌ها
۶۵	 ۳-۴-۳: سنجش سمیت سلولی بر اساس MTT
۶۵	 اصول
۶۶	 روش
۶۸	 ۳-۴-۳: فلوسایتو متری
۶۸	 ۳-۴-۳: ابزار مورد نیاز

۶۹	 روش کار
۷۰	 Real-time PCR: ارزیابی بیان ژن با روش
۷۱	 جداسازی RNA
۷۲	 ارزیابی کمی RNA استخراج شده
۷۳	 روش کار
۷۴	 سنتز cDNA تک رشته از الگوی miRNA
۷۶	 طراحی پرایمرها
۷۶	 بررسی کمی بیان ژن
۷۸	 آنالیز داده ها با روش ارزیابی نسبی
۷۹	 روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری
۷۹	 ۷-۳: ملاحظات اخلاقی
۷۹	 ۸-۳: جدول متغیرها
۸۱	 فصل چهارم: نتایج
۸۲	 ۱-۴ نتایج ارزیابی سیتوتوکسیسیته داروهای مورد مطالعه بر رده های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2
	 ۱-۱-۴ مهار رشد سلول های HeLa و CaSki و HFFF2 پس از تیمار با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان
۸۲	 ۱-۱-۱-۴ نتایج ارزیابی اثر آتورواستاتین بر زیست پذیری سلول های HeLa، CaSki و HFFF2 با استفاده از آزمون MTT
۸۵	 ۲-۱-۱-۴ نتایج ارزیابی اثر سیمواستاتین بر زیست پذیری سلول های HeLa، CaSki و HFFF2 با استفاده از آزمون MTT
۸۷	 ۳-۱-۱-۴ نتایج ارزیابی اثر سیس پلاتین بر زیست پذیری سلول های HeLa، CaSki و HFFF2 با استفاده از آزمون MTT
۸۹	 ۴-۱-۱-۴ نتایج ارزیابی اثر ایرینوتکان بر زیست پذیری سلول های HeLa، CaSki و HFFF2 با استفاده از آزمون MTT
۹۲	 ۲-۴ نتایج ارزیابی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی ترکیبات دارویی بر اساس شاخص ترکیب (CI)
	 ۱-۲-۴ نتایج ارزیابی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی تیمار ترکیبی آتورواستاتین و ایرینوتکان بر رده های سلولی HeLa و CaSki
۹۲	 ۲-۲-۴ نتایج بررسی اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین و ایرینوتکان بر رده های سلولی HeLa و CaSki
۹۵	 ۳-۲-۴ نتایج بررسی اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیب آتورواستاتین و سیس پلاتین بر رده های سلولی HeLa و CaSki

۴-۲-۴- نتایج بررسی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین و سیس پلاتین بر رده‌های سلولی HeLa و CaSki	۹۸
۴-۳- نتایج ارزیابی میزان القای آپوپتوز در رده‌های سلولی HeLa و CaSki با استفاده از فلوسایتومتری	۱۰۰
۴-۳-۱- نتایج بررسی القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های HeLa تیمار شده با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبی	۱۰۰
۴-۴- نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمارهای دارویی	۱۰۴
۴-۴-۱- تغییرات بیان ژن CDKN1B (P27) در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان	۱۰۴
۴-۴-۲- تغییرات بیان ژن BCL2 در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان	۱۰۷
۴-۴-۳- تغییرات بیان ژن CASP3 در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان	۱۰۹
۴-۴-۴- نتایج بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های CaSki	Error! Bookmark not defined.
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری	۱۱۴
۵-۱: بحث	۱۱۵
۵-۲: محدودیت‌های مطالعه :	۱۱۵
۵-۳: نتیجه گیری:	۱۳۱
۵-۴: پیشنهادات برای پژوهش‌های بعدی:	۱۳۲
۵-۵: ترجمان دانش	۱۳۳
منابع	۱۳۴

جدول ۳-۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده	۷۶
جدول ۳-۲: مقادیر لازم به ازای هر واکنش QPCR	۷۷
جدول ۳-۳: برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی	۷۸
جدول ۴-۱: میزان IC50 آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان در رده‌های سلولی HELA و CASKI و HFFF2 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت	۸۲
جدول ۴-۲: اثرات ترکیبی آتورواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HELA و CASKI پس از ۲۴ ساعت تیمار	۹۳
جدول ۴-۳: اثرات ترکیبی سیمواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HELA و CASKI پس از ۲۴ ساعت تیمار	۹۴
جدول ۴-۴: اثرات ترکیبی آتورواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HELA و CASKI پس از ۲۴ ساعت تیمار	۹۶
جدول ۴-۵: اثرات ترکیبی سیمواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HELA و CASKI پس از ۲۴ ساعت تیمار	۹۹
جدول ۴-۶: معانی کوارترهای Q1 تا Q4 در نمودار DOT PLOT فلوسایتومتری	۱۰۱

شکل ۳-۱. زیست‌پذیری سلول و شمارش سلول‌ها توسط محفظه هموسیتومتر..... ۶۵

شکل ۳-۲. اصول سنجش MTT..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

شکل ۳-۳. پلیت سنجش MTT..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

شکل ۳-۴: الکتروفورز نمونه های RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

نمودار ۴-۱: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HELA تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۴

نمودار ۴-۲: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CASKI تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۴

نمودار ۴-۳: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۵

نمودار ۴-۴: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HELA تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۵

نمودار ۴-۵: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CASKI تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۶

نمودار ۴-۶: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۶

نمودار ۴-۷: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HELA تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۷

نمودار ۴-۸: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CASKI تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۸

نمودار ۴-۹: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۸

نمودار ۴-۱۰: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HELA تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۸۹

نمودار ۴-۱۱: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CASKI تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۹۰

نمودار ۴-۱۲: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ۹۰

نمودار ۴-۱۳: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب آتورواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HELA و CASKI ۹۲

نمودار ۴-۱۴: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب سیمواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HELA و CASKI ۹۴

- نمودار ۴-۱۵: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب آتورواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HELA و CASKI ۹۶
- نمودار ۴-۱۵: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب سیمواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HELA و CASKI ۹۸
- نمودار ۴-۱۶: میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های سرطانی HELA بعد از تیمار با هشت گروه درمانی بوسیله تکنیک
فلوسایتومتری **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
- نمودار ۴-۱۸: میزان بیان CDKN1B (P27) در رده سلولی HELA تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۴
- نمودار ۴-۱۹: میزان بیان CDKN1B (P27) در رده سلولی CASKI تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۵
- نمودار ۴-۲۰: میزان بیان BCL2 در رده سلولی HELA تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۷
- نمودار ۴-۲۱: میزان بیان BCL2 در رده سلولی CASKI تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۷
- نمودار ۴-۲۲: میزان بیان CASPAS3 در رده سلولی HELA تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۰۹
- نمودار ۴-۲۳: میزان بیان CASPAS3 در رده سلولی CASKI تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل ۱۱۰
- نمودار ۴-۲۴: نمودارهای فلوسایتومتری ارزیابی آپوپتوز و نکروز در سلول‌های CASKI پس از تیمار با ایرینوتکان، سیس پلاتین،
آتورواستاتین و سیمواستاتین به صورت منفرد و ترکیبی با استفاده از رنگ آمیزی ANNEXIN V-FITC/PI ۱۱۲

فهرست مطالب

فهرست اختصارات

اختصار	نام کامل
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µg/mL	Microgram per milliliter
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
18S rRNA	18S ribosomal RNA
28S rRNA	28S ribosomal RNA
3D-CRT	Three-dimensional conformal radiotherapy
5-FU	5-Fluorouracil
ABS	American Brachytherapy Society
AIS	Adenocarcinoma in situ
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANC	Absolute neutrophil count
Annexin V-FITC	Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate
apo B100	Apolipoprotein B100
apo E	Apolipoprotein E
ASCCP	American Society for Colposcopy and Cervical Pathology
ATP	Adenosine triphosphate
BAX	BCL2-associated X apoptosis regulator
Bcl-2 / Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BT	Brachytherapy
CaSki / CaSki	CaSki cervical cancer cell line
CC	Cervical cancer
CDDP	cis-Diamminedichloroplatinum(II) / Cisplatin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
cDNA	Complementary DNA
CI	Combination index
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CIS	Carcinoma in situ
CKC	Cold knife conization
cm²	Square centimeter

CO ₂	Carbon dioxide
CoA	Coenzyme A
CPT-11	Irinotecan / Camptothecin-11
CT	Computed tomography
CTV	Clinical target volume
CTV1	Clinical target volume 1
CTV2	Clinical target volume 2
CTV3	Clinical target volume 3
CYP	Cytochrome P450
CYP2C19	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19
CYP2C9	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4
DDR	DNA damage response
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
EBRT	External beam radiotherapy
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBRACE	MRI-guided brachytherapy study in locally advanced cervical cancer
EQD2	Equivalent dose in 2-Gy fractions
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL1	Fluorescence channel 1
FL3	Fluorescence channel 3
FPP	Farnesyl pyrophosphate
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GEC-ESTRO	Groupe Européen de Curiethérapie–European Society for Radiotherapy and Oncology
GGPP	Geranylgeranyl pyrophosphate
GOG	Gynecologic Oncology Group
GTPase	Guanosine triphosphatase
GTV	Gross tumor volume
Gy	Gray
HDL	High-density lipoprotein
HDR	High dose rate
HeLa / HeLa	Henrietta Lacks cervical cancer cell line
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2 / neuroblastoma-derived oncogene homolog
HFF2	Human foreskin fibroblast cell line 2
HFFF2	Human foreskin fibroblast cell line 2
HIV	Human immunodeficiency virus
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
HPV	Human papillomavirus
HR-CTV	High-risk clinical target volume
IC10	Inhibitory concentration causing 10% inhibition/effect
IC20	Inhibitory concentration causing 20% inhibition/effect

IC30	Inhibitory concentration causing 30% inhibition/effect
IC40	Inhibitory concentration causing 40% inhibition/effect)
IC50	Half-maximal inhibitory concentration
ICBT	Intracavitary brachytherapy
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements
IMRT	Intensity-modulated radiotherapy
INR	International normalized ratio
IR-CTV	Intermediate-risk clinical target volume
ITV	Internal target volume
LDL	Low-density lipoprotein
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LDR	Low dose rate
LEEP	Loop electrosurgical excision procedure
LR-CTV	Low-risk clinical target volume
LVI	Lymphovascular invasion
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mL	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MRI	Magnetic resonance imaging
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nM	Nanomolar
OAR	Organs at risk
OATP1B1 / OATPB1	Organic anion transporting polypeptide 1B1
OATP1B3 / OATPB3	Organic anion transporting polypeptide 1B3
OD	Optical density
OD260/OD230	Optical density ratio at 260 and 230 nm
OD260/OD280	Optical density ratio at 260 and 280 nm
p27 / P27	p27Kip1 protein encoded by CDKN1B
p53 / P53	Tumor protein p53
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PET	Positron emission tomography
PET/CT	Positron emission tomography/computed tomography
P-gp	P-glycoprotein
PI	Propidium iodide
PI3K/Akt	Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway
PI3K/Akt/mTOR	Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin pathway
PTV	Planning target volume
PTV1	Planning target volume 1
PTV2	Planning target volume 2
Q1–Q4	Quadrants 1 to 4 in flow cytometry dot plot
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
QUANTEC	Quantitative Analyses of Normal Tissue Effects in the Clinic
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homolog family

Rho / RhoA	Ras homolog family member A
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolutions per minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCLC	Small-cell lung cancer
SENTICOL III	Sentinel node biopsy in cervical cancer trial III
SN-38	Active metabolite of irinotecan / 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin
SN-38G	Glucuronidated inactive metabolite of SN-38
SYBR Green	Cyanine dye used for double-stranded DNA detection in real-time PCR
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer
TNM	Tumor–Node–Metastasis staging system
UDP	Uridine diphosphate
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YAP	Yes-associated protein

بررسی اثر هم افزایی سیس پلاتین و ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین و آترواستاتین در جهت

القای مرگ سلولی در سلول های سرطان دهانه رحم

چکیده:

زمینه: سرطان دهانه رحم یکی از شایع ترین بدخیمی های زنان و از علل مهم مرگ و میر ناشی از سرطان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. اگرچه سیس پلاتین و ایرینوتکان در درمان برخی سرطان ها کاربرد دارند، مقاومت دارویی و سمیت درمانی همچنان از چالش های مهم محسوب می شوند. استاتین ها، از جمله آترواستاتین و سیمواستاتین، علاوه بر اثرات کاهنده چربی، دارای ویژگی های ضد تکثیر، پیش آپوپتوزی و ضد سرطانی گزارش شده اند. بنابراین، بررسی اثر ترکیبی این داروها می تواند رویکردی بالقوه برای افزایش مرگ سلولی و بهبود پاسخ درمانی در سرطان دهانه رحم باشد.

هدف: تعیین اثر هم افزایی سیس پلاتین و ایرینوتکان به همراه با آترواستاتین و سیمواستاتین بر مرگ سلولی، آپوپتوز و بیان ژن های مرتبط در سلول های سرطان دهانه رحم.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت آزمایشگاهی بر روی رده های سلولی HeLa و CaSki به عنوان مدل سرطان دهانه رحم و رده HFFF2 به عنوان سلول نرمال انجام شد. سلول ها با آترواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبی تیمار شدند. میزان زنده ماندن سلولی با آزمون MTT و مقدار IC50 محاسبه شد. اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیبات دارویی با شاخص ترکیبی CI ارزیابی گردید. آپوپتوز با روش فلوسایتومتری Annexin V-FITC/PI بررسی شد و بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 با Real-time PCR سنجیده شد.

نتایج: نتایج MTT نشان داد که همه داروها موجب کاهش وابسته به دوز و زمان در زنده‌مانی سلول‌ها شدند. در سلول‌های HeLa، IC50 آتورواستاتین از ۹۱,۵۸ در ۲۴ ساعت به ۷,۵۶ $\mu\text{g/mL}$ در ۴۸ ساعت و IC50 سیمواستاتین از ۷۳,۸۲ به ۳,۱۷ $\mu\text{g/mL}$ کاهش یافت. قوی‌ترین سینرژی در HeLa برای ایرینوتکان + آتورواستاتین با $\text{CI}=0.44$ و در CaSki برای آتورواستاتین + سیس‌پلاتین با $\text{CI}=0.03$ مشاهده شد. ترکیب ایرینوتکان + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + آتورواستاتین در HeLa به ترتیب ۷۲,۲۵٪ و ۷۳,۸۴٪ آپوپتوز کل ایجاد کردند. تغییرات آپوپتوز و نتیجه مهم در بیان ژن‌های P27، Bcl2 و Caspase3 گزارش شد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: ترکیب استاتین‌ها، به‌ویژه آتورواستاتین، با سیس‌پلاتین یا ایرینوتکان موجب افزایش اثر سیتوتوکسیک، تقویت آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی در سلول‌های سرطان دهانه رحم شد. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های مکمل بالقوه برای مطالعات پیش‌بالینی بعدی مطرح شوند. کلیدواژه‌ها: سرطان دهانه رحم، آتورواستاتین، آپوپتوز، سیمواستاتین، سیس‌پلاتین، ایرینوتکان

فصل اول: مقدمه

۱-۱: مقدمه

در این فصل به توضیح کلیات پژوهش پرداخته خواهد شد، ابتدا به ارائه بیان مسئله در مورد زمینه مطالعه پرداخته و سپس اهمیت موضوع و سوالات پژوهش مورد بررسی قرار خواهند گرفت. همچنین اهداف پژوهش شامل اهداف کلی، اختصاصی و فرضیات تشریح خواهد شد. این فصل به منظور فهم عمیق تر و جامع تر از زمینه و محتوای پژوهش طراحی شده است.

۱-۲: بیان مسأله

سرطان دهانه رحم^۱ از مهمترین مشکل سلامت زنان است که به عنوان چهارمین تومور شایع در زنان در نظر گرفته می شود (۱). سرطان دهانه رحم (CC) هنوز دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان کشورهای در حال توسعه است (۲). شیوع این بیماری کشنده به تدریج در سراسر جهان در حال افزایش است، بطوری که حدود ۱۸,۱ میلیون مورد جدید سرطان در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است (۱). در سال ۲۰۱۸، حدود ۵۷۰۰۰۰ زن در سراسر جهان به سرطان دهانه رحم مبتلا شدند و حدود ۳۱۱۰۰۰ زن به خاطر این بیماری جان خود را از دست دادند (۳، ۴) حدود ۶۰۴۰۰۰ مورد جدید و ۳۴۲۰۰۰ مرگ در سال ۲۰۲۰ گزارش شده است (۵). با این حال رویکرد های درمانی به طور قابل توجهی تغییر نکرده است و میزان بقای پنج ساله در سراسر جهان در طی ۱۵ سال بهبود نیافته است (۶). درمان این سرطان به وسعت بیماری و زمان تشخیص و منابع محلی و در دسترس بستگی دارد و ممکن است شامل هیستروکتومی رادیکال یا شیمی درمانی یا ترکیبی از هر دو آن ها باشد (۷، ۸). عوامل خطر سرطان دهانه رحم شامل عوامل رفتاری و عفونی است (۹). زیرگروه های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) نقش بسیار پررنگی در ایجاد سرطان های دهانه ایفا میکنند (۹). برنامه های غربالگری و واکسیناسیون در جلوگیری از این بیماری بسیار موثر بوده اند (۱، ۷). سلول سنگفرشی و آدنوکارسینوم شایع ترین زیر گروه های بافت شناسی این سرطان هستند و تقریباً

^۱ cervical cancer

به ترتیب ۷۰٪ و ۲۵٪ از کل سرطان های دهانه رحم را تشکیل می دهند (۹). در حال حاضر دو نوع روش تشخیصی برای این سرطان وجود دارد، آزمایشات غربالگری سرطان دهانه رحم: تست پاپانیکولاو^۲ و تست HPV، اولین روش باعث تشخیص ضایعات سلولی پیش سرطانی میشود و دومین روش تشخیصی میتواند انواع HPV که منجر به سرطان میشود را شناسایی میکند (۱۰). تا به امروز درمان های دارویی موثری یافت شده و مورد استفاده قرار میگیرد. سیس پلاتین یا cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) یکی از قوی ترین و پرکاربرد ترین داروهای مورد استفاده برای درمان انواع سرطان های توپر مانند تخمدان، بیضه، سر و گردن، سرطان ریه، مثانه، سرطان دهانه رحم، ملانوم، لنفوم و چندین مورد دیگر است (۱۱). سیس پلاتین موثرترین دارو برای درمان سرطان دهانه رحم در مراحل پیشرفته و متاستاتیک است (۱۲) و مقاومت به سیس پلاتین عامل اصلی عود و مرگ و میر گزارش شده است (۱۳). علاوه بر این، درمان های ترکیبی سیس پلاتین با سایر داروها برای غلبه بر مقاومت دارویی و کاهش سمیت بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۴). ایرینوتکان یک مهارکننده DNA توپوایزومراز I است و به عنوان یک داروی شیمی درمانی علیه تومور های توپر مانند سرطان پانکراس، ریه، تخمدان و روده بزرگ استفاده میشود (۱۵). استاتین ها نیز داروهای دیگری هستند، که خواص ضد سرطانی از خود نشان داده اند. استاتین ها اختصاصا مهارکننده های ۳ هیدروکسی - متیل گلوکاریل coa ردوکتاز (HMG-CoA R) هستند و به طور گسترده برای درمان کلسترول خون و پیشگیری از بیماری های قلبی مورد استفاده قرار گرفته اند. در مطالعات متعدد گزارش شده است که داروی آتورواستاتین به عنوان یک مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز، بر تکثیر، مهاجرت و بقای سلول های سرطانی تاثیر میگذارد (۱۵) و سیمواستاتین ها نیز که از استاتین ها است خواص ضد سرطانی از خود نشان داده است (۱۶). بررسی ها نشان داده است که سیمواستاتین و آتورواستاتین بیشترین اثر ضد تکثیری را در بین دیگر استاتین ها بر سلول های سرطانی دارند مانند اثرات ضد تکثیری، پیش آپوپتوزی، ضد رگ زایی، تعدیل کننده ایمنی و غیرتهاجمی، که آن ها را به عنوان درمانی امیدوارکننده در برابر بسیاری از

^۲ Papanikolaou test

سرطان‌ها مانند سرطان کبد (۱۷)، سرطان روده بزرگ و سرطان سینه مطرح می‌کند (۱۹). با توجه به موارد فوق، بنظر می‌رسد درمان ترکیبی بتواند نتایج موثرتری را در افزایش آپوپتوز سلولهای سرطان دهانه رحم و مهار مهاجرت پذیری آنها ایفا کند. هدف از این مطالعه نیز مقایسه داروهای هم گروه باهم و بررسی تاثیر درمان ترکیبی بر بیان ژن های آپوپتوتیک و مهاجرت سلول های سرطانی دهانه رحم است. در صورت موفقیت این درمان ترکیبی می‌توان به طور موثرتری به شیمی درمانی سرطان دهانه رحم و موفقیت درمانی، امیدوارتر بود و پتانسیل رژیم درمانی دو وسه دارویی را با استاتین‌ها مطرح کرد.

۳-۱: اهداف و فرضیات طرح

۱-۳-۱: اهداف کلی:

تعیین اثر هم افزایی سیس پلاتین و ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین و آترواستاتین در جهت القای مرگ سلولی در سلول های سرطان دهانه رحم

۱-۳-۲: اهداف اختصاصی:

۱. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم
۲. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم
۳. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم
۴. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم
۵. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم

۶. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم

۷. تعیین میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم

۸. تعیین میزان آپوپتوز پس از تیمار با سیس پلاتین، ایرینوتکان، سیمواستاتین و آترواستاتین به صورت جداگانه و ترکیبی بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم

۹. تعیین میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم.

۱۰. تعیین میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه آترواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم.

۱۱. تعیین میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه سیمواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم.

۱۲. تعیین میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه آترواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم.

۱۳. تعیین میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین، ایرینوتکان، سیمواستاتین و آترواستاتین به صورت جداگانه در سلول های سرطانی دهانه رحم.

۳-۳-۱، اهداف کاربردی :

نتایج این مطالعه ممکن است منجر به ارائه ترکیبات موثر در القای مرگ سلول های سرطانی و کنترل بیماری در کنار روش های درمانی روتین در درمان کنسر دهانه رحم شود.

۴-۱: فرضیات یا سوالات طرح

۱. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۲. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۳. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۴. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۵. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۶. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه سیمواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۷. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه آترواستاتین بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۸. آیا میزان مرگ سلولی پس از تیمار با سیس پلاتین ایرینوتکان سیمواستاتین و آترواستاتین به صورت جداگانه بر روی سلول های سرطانی دهانه رحم افزایش می یابد؟
۹. آیا میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم تغییر می یابد؟
۱۰. آیا میزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با ایرینوتکان به همراه آترواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم تغییر می یابد؟

۱۱. آیامیزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه سیمواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم تغییر می یابد؟
۱۲. آیامیزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین به همراه آترواستاتین در سلول های سرطانی دهانه رحم تغییر می یابد؟
۱۳. آیامیزان بیان ژن های CDKN1B/P27، Bcl2 و Caspase3 پس از تیمار با سیس پلاتین ایرینوتکان سیمواستاتین و آترواستاتین به صورت جداگانه در سلول های سرطانی دهانه رحم تغییر می یابد؟

۵-۱: تعاریف واژه اختصاصی

سرطان دهانه رحم:

تعریف علمی: سرطان دهانه رحم از مهمترین مشکل سلامت زنان است که به عنوان چهارمین تومور شایع در زنان در نظر گرفته می شود (۱۵).

تعریف عملی: مدل سلولی مورد استفاد در این پژوهش سرطان دهان رحم میباشد.

ایرینوتکان:

تعریف علمی: ایرینوتکان یک مهارکننده DNA توپوایزومراز I است و به کمپلکس I-DNA توپوایزومراز متصل می شود و از بازگشت مجدد شکستگی های تک رشته ای جلوگیری می کند. از داروهای ضد سرطان است که برای درمان سرطان روده بزرگ و سرطان سلول کوچک ریه و تخمدان استفاده می شود (۶).

تعریف عملی: مطابق تعریف علمی

سیس پلاتین: سیس پلاتین یک ترکیب شیمیایی با فرمول $[Pt (NH_3)_2Cl_2]$ cis- است که با اتصال به (DNA) و تشکیل ترکیب های اضافی DNA درون رشته ای که منجر به مهار سنتز DNA و رشد سلول می شود به عنوان یک داروی شیمی درمانی برای درمان تعدادی از سرطان ها از جمله سرطان بیضه، سرطان دهانه رحم و سرطان سر و گردن استفاده می شود (۱۱).

تعریف عملی: مطابق تعریف علمی

سیمواستاتین: نوعی داروی کاهنده چربی است که با کاهش غلظت کلسترول کبدی باعث تحریک گیرنده های لیپوپروتئین با چگالی کم LDL کبدی می شود که جذب کبدی LDL را افزایش می دهد و همراه با ورزش، رژیم غذایی و کاهش وزن برای کاهش سطح چربی بالا استفاده می شود (۱۸).

تعریف عملی: مطابق تعریف علمی

آترواستاتین: یک داروی استاتین است که به عنوان یک مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز بر تکثیر، مهاجرت و بقای سلول های سرطانی تاثیر میگذارد. برای پیشگیری از بیماری های قلبی عروقی در افراد در معرض خطر بالا و برای درمان سطوح غیر طبیعی چربی استفاده می شود (۱۶).

تعریف عملی: مطابق تعریف علمی

فصل دوم: بررسی

متون

۱-۲: مبانی نظری

۱-۱-۲، سرطان دهانه رحم

سرطان دهانه رحم همچنان یکی از مهم‌ترین سرطان‌های زنان در سراسر جهان محسوب می‌شود. بر اساس داده‌های موجود، این سرطان در میان تمام سرطان‌ها رتبه چهاردهم و در میان سرطان‌های زنان، رتبه چهارم شایع‌ترین سرطان را در جهان به خود اختصاص داده است. مداخلات مرتبط با سرطان دهانه رحم عمدتاً بر پیشگیری اولیه و ثانویه متمرکز هستند (۱۹). پیشگیری اولیه و غربالگری، مؤثرترین روش‌ها برای کاهش بار بیماری و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان دهانه رحم به شمار می‌روند.

در ایالات متحده و سایر کشورهای توسعه‌یافته، بیشتر اقدامات غربالگری و تشخیصی بر شناسایی زودهنگام ضایعات پرخطر ناشی از ویروس پاپیلومای انسانی پرخطر، از طریق آزمون HPV و اسمیر پاپانیکولاو یا پاپاسمیر متمرکز است. اگرچه انجام آزمون HPV در زنان کمتر از ۳۰ سال توصیه نمی‌شود، زنان جوان کم‌خطر باید مطابق توصیه‌های «کارگروه خدمات پیشگیرانه ایالات متحده» غربالگری با تست پاپاسمیر را از سن ۲۱ سالگی آغاز کرده و تا ۶۵ سالگی ادامه دهند. توصیه‌های جدیدتر، با توجه به نتایج قبلی بیمار و استفاده از پاپاسمیر همراه با آزمون HPV، فاصله‌های ۳ تا ۵ ساله را برای انجام غربالگری پیشنهاد می‌کنند (۲۰).

همانند بسیاری از بیماری‌ها و سرطان‌ها، نابرابری‌هایی در میزان غربالگری، تشخیص زودهنگام و درمان به موقع سرطان دهانه رحم وجود دارد. میزان غربالگری در مناطق دارای وضعیت اقتصادی - اجتماعی پایین و منابع محدود کمتر است و این تفاوت‌ها بر اساس نژاد، قومیت و سن نیز مشاهده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که زنان مبتلا به چاقی و بیماری‌های مزمن ممکن است کمتر تحت غربالگری سرطان دهانه رحم و سرطان پستان قرار گیرند. در مطالعه‌ای بر روی زنان متعلق به اقلیت‌های قومی در بریتانیا، موانع متعددی برای انجام غربالگری گزارش شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به کمبود آگاهی، ترس، احساس خجالت،

شرم و پابین بودن درک خطر ابتلا اشاره کرد. مطالعه دیگری که موانع غربالگری در زنان کشور هائیتی^۳ را بررسی کرده بود، نشان داد که موانع اقتصادی - اجتماعی، مشکلات زبانی و درک محدود از سلامت و بیماری از ع^۳وامل مهم بازدارنده هستند (۲۱). در ایالات متحده نیز مرگومیر ناشی از سرطان دهانه رحم به طور نامتناسبی در میان زنان سیاه پوست بیشتر گزارش شده است.^۴

از آنجا که عفونت ویروس پاپیلومای انسانی، به عنوان عامل اصلی سرطان دهانه رحم، از طریق تماس جنسی منتقل می شود، این سرطان تا حد زیادی قابل پیشگیری است و می توان بروز جهانی آن را از طریق آموزش هدفمند، غربالگری و مداخلات پیشگیرانه کاهش داد. از سال ۲۰۰۶، واکسیناسیون برای پیشگیری از سرطان دهانه رحم در دسترس قرار گرفته است. واکسیناسیون می تواند در کاهش مرگومیر ناشی از این سرطان، به ویژه در جمعیت هایی با میزان مرگومیر بالاتر و در کشورهای در حال توسعه که امکان دسترسی منظم به برنامه های غربالگری محدود است، نقش مؤثری ایفا کند.

۲-۱-۱-۱، علت شناسی

مطالعات موجود نشان می دهند که ویروس پاپیلومای انسانی یا HPV در اغلب افراد فعال از نظر جنسی، در مقطعی از زندگی مشاهده می شود. تاکنون بیش از ۱۳۰ نوع HPV شناخته شده است که از میان آنها، حدود ۲۰ نوع با بروز سرطان ارتباط دارند. میزان مواجهه با HPV عمدتاً در زنان مشخص شده است، زیرا مردان معمولاً خارج از پروتکل های پژوهشی تحت غربالگری قرار نمی گیرند. انواع ۱۶ و ۱۸ HPV شایع ترین تیپ های شناسایی شده در سرطان مهاجم دهانه رحم هستند. مطالعات جمعیتی درباره شیوع HPV نشان داده اند که بیشترین شیوع HPV پرخطر در بزرگسالان کمتر از ۲۵ سال رخ می دهد، در حالی که مرگومیر ناشی از سرطان دهانه رحم معمولاً در زنان میان سال، به ویژه در سنین ۴۰ تا ۵۰ سال، به اوج می رسد. شواهد نشان می دهد که بیماری های دهانه رحم مرتبط با HPV در زنان کمتر از ۲۵ سال، در بیشتر موارد

^۳ Haiti

خود محدودشونده هستند. با این حال، در زنانی که به طور همزمان به چند نوع HPV آلوده هستند، احتمال پاک سازی خودبه خودی ویروس کمتر بوده و خطر پیشرفت ضایعه به سمت سرطان افزایش می یابد.

HPV از طریق تماس پوست با پوست منتقل می شود؛ از جمله طی رابطه جنسی، تماس دست با ناحیه تناسلی و رابطه دهانی. عوامل خطر مرتبط با عفونت HPV و سرطان دهانه رحم شامل شروع رابطه جنسی در سن پایین، داشتن شرکای جنسی متعدد، تعداد بالای زایمان، مصرف دخانیات، ابتلا به ویروس هرپس سیمپلکس، عفونت HIV، همزمانی با سایر عفونت های تناسلی و مصرف قرص های ضدبارداری خوراکی است (۲۲).

۲-۱-۱-۲، اپیدمیولوژی

عفونت پایدار HPV علت بیش از ۹۹ درصد موارد سرطان دهانه رحم محسوب می شود. سالانه بیش از ۵۰۰ هزار مورد جدید سرطان دهانه رحم و حدود ۲۵۰ هزار مرگ ناشی از این سرطان در سراسر جهان گزارش می شود. حدود ۸۰ درصد موارد بیماری در کشورهای در حال توسعه رخ می دهد. در ایالات متحده، سالانه حدود ۴۰۰۰ زن بر اثر سرطان دهانه رحم جان خود را از دست می دهند. زنان سیاه پوست، زنان با نژاد یا قومیت هیسپانیک و زنان ساکن مناطق کم برخوردار، در دسترسی به مراقبت های مبتنی بر شواهد با نابرابری بیشتری مواجه اند و میزان مرگ و میر در آنها به طور معنی داری بالاتر است (۲۳). مرگ و میر در زنانی که طی پنج سال گذشته غربالگری نشده اند و همچنین در افرادی که پس از شناسایی ضایعات پیش سرطانی دهانه رحم پیگیری منظم نداشته اند، بیشتر گزارش شده است. روندها نشان می دهند زنانی که در معرض بیشترین خطر مرگ و میر قرار دارند، ممکن است کمتر واکسن HPV را دریافت کرده باشند.

۳-۱-۱-۲، پاتوفیزیولوژی

بیش از ۷۵ درصد موارد سرطان دهانه رحم ناشی از تیپ های پرخطر HPV، به ویژه انواع ۱۶ و ۱۸ است. با این حال، سایر انواع HPV نیز می توانند در ایجاد بدخیمی نقش داشته باشند. برخی تیپ های کم خطر

HPV، به خصوص انواع ۶ و ۱۱، موجب ایجاد کوندیلوما آکومیناتا^۴ می‌شوند که به طور معمول با عنوان زگیل‌های ناحیه تناسلی - مقعدی شناخته می‌شوند. اگرچه سالانه بیش از نیم میلیون مورد عفونت HPV شناسایی می‌شود، بیشتر این موارد از نوع عفونت‌های کم‌درجه بوده و طی دو سال به صورت خودبه‌خودی برطرف می‌شوند. پیشرفت ضایعات پرخطر و تبدیل آن‌ها به سرطان معمولاً در حضور سایر عوامل خطر سرطان‌زا رخ می‌دهد که پیش‌تر به آن‌ها اشاره شد.

در DNA ویروس HPV، انکوپروتئین‌های E6 و E7 با چرخه حیاتی سلول میزبان تداخل می‌کنند. به طور مشخص، پروتئین E6 عملکرد پروتئین سرکوبگر تومور p53 را مختل می‌کند، در حالی که پروتئین E7 با پروتئین رتینوبلاستوما یا pRB تداخل دارد. افزون بر این، پروتئین E5 نیز ممکن است در فرار ویروس از پاسخ ایمنی نقش داشته باشد. این عوامل در بروز نئوپلازی‌های مرتبط با HPV، از جمله سرطان اولیه واژن، اهمیت قابل توجهی دارند. همچنین تصور می‌شود که استرس اکسیداتیو و میکروRNAها در فرایند سرطان‌زایی دهانه رحم نقش داشته باشند، هرچند برای روشن‌تر شدن تعامل میان این عوامل، انجام پژوهش‌های بیشتر ضروری است (۲۴).

۲-۱-۱-۴، هیستوپاتولوژی

کارسینوم سلول سنگفرشی و آدنوکارسینوم، شایع‌ترین زیرگروه‌های بافت‌شناختی سرطان دهانه رحم هستند؛ با این تفاوت که کارسینوم سلول سنگفرشی به مراتب شایع‌تر است. آدنوکارسینوم حدود ۵ درصد سرطان‌های مهاجم دهانه رحم را در سطح جهان تشکیل می‌دهد، هرچند این نسبت در برخی کشورها رو به افزایش است. هر دو زیرگروه از ضایعات پیش‌ساز، شامل نئوپلازی داخل‌اپی‌تلیالی دهانه رحم یا CIN و کارسینوم درجا یا CIS منشأ می‌گیرند. کارسینوم سنگفرشی درجا و آدنوکارسینوم درجا یا AIS، نزدیک‌ترین ضایعات پیش‌ساز سرطان مهاجم دهانه رحم محسوب می‌شوند. آدنوکارسینوم دهانه رحم باید با

^۴ Condylomata Acuminata

دقت از آدنوکارسینوم آندومتر افتراق داده شود که این کار از طریق ایمونوهیستوشیمی و هیبریداسیون درجا برای HPV امکان پذیر است (۲۵).

بیشتر بدخیمی‌ها از ناحیه اتصال سنگفرشی - ستونی دهانه رحم منشأ می‌گیرند. از نظر میکروسکوپی، ممکن است لانه‌های نامنظم و آناستوموزدهنده یا سلول‌های منفرد توموری همراه با التهاب استروما یا دسموپلازی مشاهده شوند. تهاجم لنفاوی - عروقی یا LVI نیز ممکن است وجود داشته باشد. درجه‌بندی تومور بر اساس پلی‌مورفیسم هسته‌ای، اندازه هستک‌ها، فعالیت میتوزی و نکروز انجام می‌شود، اما این درجه‌بندی الزاماً با پیش‌آگهی بیمار همبستگی ندارد.

۲-۱-۱-۵، شرح حال و معاینه فیزیکی

بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم معمولاً در مراحل اولیه بیماری بدون علامت هستند. اخذ شرح حال کامل باید شامل بررسی سابقه جنسی بیمار، از جمله سن نخستین تماس جنسی باشد. شرح حال جنسی همچنین باید پرسش‌هایی درباره خونریزی پس از رابطه جنسی و درد هنگام مقاربت را در بر گیرد. پرسش درباره سابقه عفونت‌های منتقله از راه جنسی، از جمله HPV و HIV، تعداد شرکای جنسی در طول زندگی، مصرف دخانیات و سابقه واکسیناسیون علیه HPV نیز اهمیت زیادی دارد. همچنین لازم است از زنان درباره الگوی قاعدگی، خونریزی غیرطبیعی، ترشحات واژینال پایدار، تحریکات ناحیه تناسلی و ضایعات شناخته‌شده دهانه رحم سؤال شود (۲۶).

معاینه فیزیکی باید شامل ارزیابی کامل دستگاه تناسلی خارجی و داخلی باشد. یافته‌های مثبت در معاینه زنان مبتلا به سرطان دهانه رحم ممکن است شامل دهانه رحم شکننده و خونریزی‌دهنده، ضایعات قابل مشاهده در دهانه رحم، اروزیون، توده، خونریزی هنگام معاینه و ثابت بودن آدنکس‌ها باشد. با این حال، بسیاری از بیماران در معاینه فیزیکی یافته غیرطبیعی واضحی ندارند. بنابراین، غربالگری با پاپ‌اسمیر و یا آزمون HPV در بررسی و تشخیص سرطان دهانه رحم و ضایعات پیش‌ساز آن ضروری است.

۲-۱-۱-۶، ارزیابی و تشخیص

بر اساس توصیه‌های کارگروه خدمات پیشگیرانه ایالات متحده، غربالگری با پاپ‌اسمیر از سن ۲۱ سالگی توصیه می‌شود. از سن ۳۰ سالگی، آزمون HPV همراه با سیتولوژی پاپ‌اسمیر آغاز می‌شود. در زنانی که نتایج غربالگری مداوم آن‌ها منفی بوده و در معرض خطر پایین سرطان دهانه رحم قرار دارند، انجام غربالگری هر سه سال یک‌بار توصیه می‌شود. در زنان بالای ۳۰ سال، سیتولوژی می‌تواند همراه با آزمون HPV هر پنج سال یک‌بار انجام شود. یکی از توصیه‌های سطح A برای زنان کم‌خطر با نتایج غربالگری پیوسته منفی، قطع سیتولوژی دهانه رحم و آزمون HPV در سن ۶۵ سالگی است. زنانی که به دلیل بیماری خوش‌خیم تحت هیستریکتومی کامل شکمی همراه با برداشت دهانه رحم قرار گرفته‌اند، به غربالگری بعدی نیاز ندارند (۲۰).

کولپوسکوپی روش تشخیصی انتخابی برای ارزیابی سیتولوژی غیرطبیعی و یا عفونت پایدار با HPV پرخطر است. انجمن آمریکایی کولپوسکوپی و پاتولوژی دهانه رحم یا ASCCP^۵ دستورالعمل‌هایی را درباره موارد اندیکاسیون این روش ارائه کرده است و الگوریتم‌های پیشنهادی آن به‌عنوان استاندارد مراقبت در نظر گرفته می‌شوند. در بسیاری از موارد، انجام چندین نمونه‌برداری هدایت‌شده با کولپوسکوپی و نمونه‌گیری از کانال اندوسرویکس ضرورت دارد؛ البته این موضوع در دوران بارداری با ملاحظات خاص همراه است. یافته‌های غیرطبیعی کولپوسکوپی می‌تواند شامل تغییر رنگ سفید پس از استفاده از اسید استیک، عروق‌زایی برجسته، عروق غیرطبیعی، الگوی موزاییکی و نقطه‌گذاری باشد.

بیمارانی که سرطان مهاجم در آن‌ها تشخیص داده می‌شود، نیازمند بررسی کامل مرحله‌بندی بیماری هستند. سیستم مرحله‌بندی فدراسیون بین‌المللی زنان و زایمان یا FIGO از روش‌های مختلفی برای تعیین مرحله بیماری استفاده می‌کند. به‌طور کلاسیک، مرحله‌بندی بر اساس وسعت موضعی تومور انجام می‌شد و با ترکیبی از معاینه لگنی، سیستوسکوپی، پروکتوسکوپی، رادیوگرافی قفسه سینه، پیلوگرافی داخل‌وریدی و

^۵ American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

آزمایش‌های پایه قابل ارزیابی بود. در سال‌های اخیر، روش‌های تصویربرداری پیشرفته مانند PET و MRI نیز برای مرحله‌بندی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. MRI. لگن برای شناسایی گسترش موضعی تومور بسیار مناسب است و همچنین می‌تواند برای پایش پاسخ تومور به درمان به کار رود. PET scan در مقایسه با CT scan برای شناسایی متاستازهای غدد لنفاوی و احشایی حساس‌تر است. این موضوع اهمیت بالایی دارد، زیرا درگیری غدد لنفاوی می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر پیش‌آگهی بیمار اثر بگذارد (۲۷).

۲-۱-۱-۷، درمان و مدیریت

ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم در زنان کمتر از ۲۵ سال معمولاً به‌صورت محافظه‌کارانه مدیریت می‌شوند. بیشتر یافته‌های مثبت در این گروه سنی، دیسپلازی‌های کم‌خطر دهانه رحم هستند و اغلب به‌طور خودبه‌خودی برطرف می‌شوند. کولپوسکوپی برای ارزیابی مواردی به کار می‌رود که سیتولوژی غیرطبیعی به‌صورت پایدار وجود دارد یا ضایعات از نظر خطر متوسط یا بالا مشکوک هستند. نحوه مدیریت این موارد بر اساس یافته‌های به‌دست‌آمده تعیین می‌شود.

ضایعات کم‌خطر ممکن است تحت نظر قرار گرفته و با فواصل کوتاه‌تر مجدداً ارزیابی شوند. در مقابل، ضایعات پرخطر بر اساس اندازه، عمق و محل درگیری درمان می‌شوند. برای ضایعات پیش‌سرطانی که از نظر اندازه و عمق محدود هستند، از کرایوتراپی یا برداشت ضایعه استفاده می‌شود. در ضایعات گسترده‌تر یا ضایعاتی که کانال اندوسرویکس را درگیر می‌کنند، روش‌هایی مانند کونیزاسیون، لیزر یا برداشت الکتروسرجیکال با لوپ یا LEEP^۶ به کار می‌رود. روش LEEP می‌تواند امکان مشاهده بهتر ناحیه اتصال سنگفرشی - ستونی را فراهم کند و در محیط سرپایی با خونریزی کمتری همراه باشد (۲۸).

در صورت تشخیص سرطان مهاجم، مرحله بعدی در مدیریت بیمار، مرحله‌بندی بیماری برای تعیین درمان مناسب است. مرحله‌بندی بر اساس علائم و نشانه‌های گزارش‌شده، یافته‌های معاینه، آسیب‌شناسی بافتی و

^۶ Loop electrosurgical excision procedure

تصویربرداری انجام می‌شود. درجه‌بندی نیز بر اساس اندازه و عمق نفوذ سرطان و شواهد گسترش آن به سایر اندام‌ها تعیین می‌گردد. درمان بیماری در مراحل اولیه معمولاً بر پایه برداشت جراحی است و می‌تواند از کونیزاسیون تا هیستریکتومی رادیکال تعدیل شده متغیر باشد. با این حال، زنانی که پس از برداشت جراحی دارای یافته‌های آسیب‌شناسی پرخطر هستند، ممکن است به درمان کمکی با شیمی‌درمانی و پرتودرمانی نیاز داشته باشند. در زنان مبتلا به بیماری در مراحل اولیه که تمایل به حفظ باروری در آینده دارند، کونیزاسیون یا تراکلکتومی^۷ می‌تواند گزینه درمانی مناسبی باشد. در بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته‌تر، شیمی‌درمانی هم‌زمان با پرتودرمانی به‌عنوان استاندارد درمان در نظر گرفته می‌شود.

۸-۱-۱-۲، تشخیص افتراقی

ارزیابی ضایعات قابل مشاهده دهانه رحم از نظر احتمال سرطان مهاجم ضروری است. با این حال، همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، بیشتر موارد سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه بدون علامت هستند و معمولاً با توده آشکار تظاهر نمی‌یابند. سایر علل احتمالی ضایعات دهانه رحم یا خونریزی غیرطبیعی شامل عفونت‌های منتقله از راه جنسی، پولیپ‌ها یا فیبروم‌های دهانه رحم و آندومتریوز است. تشخیص ممکن است نیازمند بررسی دقیق‌تر علائم و انجام آزمون‌های تکمیلی باشد تا مشخص شود آیا بیماری واقعاً سرطان دهانه رحم است یا خیر. برای قطعی شدن تشخیص، انجام بیوپسی تشخیصی ضروری است.

برخی شرایط دیگر که بر اساس یافته‌های آسیب‌شناسی در تشخیص افتراقی مطرح می‌شوند، شامل کارسینوسارکوم، تومور تروفوبلاستیک اپی‌تلوئید، ندول محل جفت، متاپلازی سنگفرشی نابالغ و بیماری متاستاتیک ناشی از یک تومور اولیه غیر از دهانه رحم هستند. به‌ندرت، ممکن است در یک پاپ‌اسمیر روتین، سرطان متاستاتیک در دهانه رحم شناسایی شود.

انکولوژی جراحی

^۷ Trachelectomy

برداشت جراحی برای بیمارانی پیشنهاد می‌شود که بیماری در مرحله اولیه بوده و محدود به دهانه رحم است. دامنه این روش‌ها می‌تواند از اقدامات نسبتاً کم‌تهاجمی مانند کونیزاسیون دهانه رحم تا جراحی‌های گسترده‌تر مانند هیستروکتومی رادیکال متغیر باشد. اگرچه جراحی، روش درمانی ارجح در سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه محسوب می‌شود، اما اهمیت آن به‌ویژه در بیماران جوان‌تر بیشتر است؛ زیرا در این گروه، حفظ عملکرد تخمدان و یا حفظ باروری ممکن است مورد نظر باشد. همچنین جراحی در برخی بیماران منتخب مبتلا به عود بیماری نیز اندیکاسیون دارد.

انواع جراحی

کونیزاسیون دهانه رحم

کونیزاسیون دهانه رحم معمولاً در بیماران مبتلا به کارسینوم درجا یا سرطان مهاجم دهانه رحم در مرحله IA1 اندیکاسیون دارد. در این روش، با استفاده از اسکالپل یا لیزر، کون سرد با چاقو یا CKC^8 انجام می‌شود که طی آن ناحیه ترانسفورماسیون دهانه رحم و بخشی از سرویکس با حاشیه حداقل ۳ میلی‌متر برداشته می‌شود. ارزیابی پاتولوژیک حاشیه‌های برداشت‌شده و بررسی وجود یا عدم وجود تهاجم لنفاوی - عروقی یا LVI اهمیت زیادی دارد. در صورت مثبت بودن حاشیه جراحی یا وجود LVI، ممکن است برداشت مجدد یا درمان جراحی تهاجمی‌تر ضرورت پیدا کند.

اگر در نمونه برداشته‌شده LVI وجود نداشته باشد، درگیری غدد لنفاوی بسیار نادر است؛ بنابراین ارزیابی غدد لنفاوی ضرورتی ندارد. بیمارانی که فاقد یافته‌های پاتولوژیک نامطلوب هستند، می‌توانند تحت پیگیری و مشاهده قرار گیرند. میزان عود معمولاً کمتر از ۱۰ درصد است، اما بیماران باید با کولپوسکوپی و سیتولوژی دوره‌ای به‌دقت پیگیری شوند. میزان بقای پنج‌ساله در این بیماران بیش از ۹۵ درصد گزارش شده است. عوارض احتمالی شامل خونریزی، عفونت، نارسایی دهانه رحم، تنگی سرویکس و ناباروری است. میزان عوارض این روش بین ۲ تا ۱۲ درصد گزارش شده است (۲۹).

تراکتومی رادیکال

بیمارانی که به دلیل ویژگی‌های پاتولوژیک نامطلوب یا بیماری پیشرفته‌تر، کاندید مناسبی برای کونیزاسیون نیستند، اما تمایل به حفظ باروری در آینده دارند، می‌توانند کاندید تراکلکتومی رادیکال باشند. این روش شامل برداشت بخش عمده دهانه رحم، رزکسیون پارامتریوم و آزادسازی حالب‌ها، مثانه و رکتوم است. در این جراحی، بخشی به اندازه ۵ میلی‌متر از دهانه رحم برای قرار دادن سرکلار حفظ می‌شود تا امکان بارداری آینده فراهم گردد. به دلیل افزایش خطر درگیری غدد لنفاوی، ارزیابی غدد لنفاوی معمولاً همراه با بیوپسی گره نگهبان یا لنفادنکتومی لگنی انجام می‌شود.

وجود ویژگی‌های پاتولوژیک نامطلوب مانند حاشیه مثبت، درگیری پارامتریوم، درگیری غدد لنفاوی یا احراز معیارهای⁹ Sedlis نیاز به درمان کمکی با پرتودرمانی با یا بدون شیمی‌درمانی را مطرح می‌کند. این جراحی می‌تواند از راه واژینال یا لاپاراتومی انجام شود، اما داده‌های کافی درباره روش‌های کم‌تهاجمی وجود ندارد. میزان عود پنج‌ساله حدود ۵ درصد و میزان بقای کلی ۹۷ درصد گزارش شده است. میزان بارداری پس از این روش ۲۴ درصد است و تولد زنده^۸ در ۷۵ درصد بیماران رخ می‌دهد. عوارض احتمالی شامل مشکلات مربوط به بخیه سرویکس، دیسمنوره، تنگی ایسم، و ترشحات واژینال است.

هیستریکتومی اکسترافاشیال

هیستریکتومی اکسترافاشیال که با عنوان هیستریکتومی رادیکال نوع A نیز شناخته می‌شود، محدوده اندیکاسیون بالینی نسبتاً محدودی دارد. این جراحی معمولاً برای بیماران مبتلا به بیماری مرحله IA1 پیشنهاد می‌شود که تمایلی به حفظ باروری آینده ندارند. در این روش، کل دهانه رحم و رحم برداشته می‌شود. از آنجا که برداشت تخمدان اختیاری است، می‌توان عملکرد تخمدان را حفظ کرد. در این روش، پارامتریوم برداشته نمی‌شود و جراحی می‌تواند از راه واژینال یا لاپاراتومی انجام گیرد. ارزیابی غدد لنفاوی معمولاً انجام نمی‌شود، مگر اینکه پس از جراحی، ویژگی‌های پاتولوژیک نامطلوب شناسایی شود. بیمارانی که

^۸ Cold knife conization

^۹ Sedlis criteria for Adjuvant pelvic Radiotherapy in Early-Stage cervical Cancer

دارای یافته‌های پاتولوژیک نامطلوب هستند، ممکن است به پارامتر وکتومی کامل یا پرتودرمانی خارجی با یا بدون شیمی‌درمانی نیاز داشته باشند.

هیستریکتومی رادیکال

هیستریکتومی رادیکال تقریباً در بیشتر موارد سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه، زمانی که حفظ باروری مدنظر نیست، می‌تواند در نظر گرفته شود. طبقه‌بندی قدیمی Piver-Rutledge-Smith با سیستم Querleu-Morrow جایگزین شده است؛ سیستمی که طبقه‌بندی را صرفاً بر اساس میزان برداشت پارامتریوم جانبی ساده‌تر می‌کند. چهار نوع هیستریکتومی رادیکال، از نوع A تا D، توصیف شده است. نوع A شامل برداشت حداقلی پارامتریوم است؛ در مقابل، نوع D ناحیه پارسرویکال را به‌طور کامل تا دیواره جانبی لگن برمی‌دارد. شایع‌ترین انواع هیستریکتومی رادیکال انجام‌شده در گروه‌های نوع B و C قرار می‌گیرند که تفاوت آن‌ها در محل قطع ناحیه پارسرویکال، به‌ترتیب در سطح حالب‌ها یا عروق ایلپاک داخلی است (۳۰).

مطالعات نشان داده‌اند که روش‌های کم‌تهاجمی، در مقایسه با رویکردهای باز و تثبیت‌شده‌تر، پیامدهای انکولوژیک ضعیف‌تری دارند؛ به‌طوری که بقای بدون بیماری در این روش‌ها ۹۱ درصد در برابر ۹۷ درصد و بقای کلی ۹۳ درصد در برابر ۹۹ درصد گزارش شده است. بیشتر بیماران در این مطالعات مبتلا به بیماری مرحله IB1 بودند. عوارض احتمالی هیستریکتومی رادیکال شامل خونریزی، عفونت، ترومبوآمبولی وریدی، آمبولی ریه، انسداد روده باریک، فیستول وزیکوواژینال، هیدرونفروز، آسیب حالب، بی‌اختیاری ادراری استرسی و ادم اندام تحتانی است.

هیستریکتومی رادیکال لاپاروسکوپیک

اگرچه این روش می‌تواند با بهبودی سریع‌تر بیمار همراه باشد، اما به دلیل پیامدهای ضعیف‌تر انکولوژیک و افزایش میزان عود در مقایسه با جراحی باز، تا حد زیادی کنار گذاشته شده است. مکانیسم این تفاوت هنوز مشخص نیست، اما دو مطالعه بزرگ مستقل این یافته را تأیید کرده‌اند.

ارزیابی غدد لنفاوی

تشخیص درگیری غدد لنفاوی اهمیت اساسی دارد، زیرا اطلاعات مهمی درباره پیش‌آگهی بیماری فراهم می‌کند و در تصمیم‌گیری درمانی نقش تعیین‌کننده دارد. خطر درگیری غدد لنفاوی باید راهنمای تصمیم‌گیری درباره ارزیابی آن‌ها باشد و این خطر تابعی از مرحله بیماری است. خطر درگیری غدد لنفاوی پارائورت معمولاً حدود نیمی از خطر درگیری غدد لنفاوی لگنی در همان مرحله بیماری است. اگرچه لنفادنکتومی لگنی همچنان به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته می‌شود، اما در برخی بیماران منتخب مبتلا به سرطان دهانه رحم در مرحله اولیه، بیوپسی گره نگهبان نیز قابل انجام است.

به‌طور کلی، بیوپسی گره نگهبان روشی ایمن و مؤثر محسوب می‌شود. این روش در بیماران مرحله IA1 تا IIA1 بررسی شده و حساسیت ۹۲ درصد، ارزش اخباری منفی ۹۸ درصد، عوارض لنفاوی کمتر و عدم تفاوت در بقای بدون عود را نشان داده است (۳۱). رویکرد بیوپسی گره نگهبان همچنان در کارآزمایی‌های بین‌المللی بزرگ، از جمله SENTICOL III، در حال بررسی است.

اگزنتراسیون لگنی

اگزنتراسیون لگنی رادیکال‌ترین روش جراحی در درمان سرطان دهانه رحم محسوب می‌شود. اندیکاسیون‌های این روش معمولاً محدود به بیمارانی است که پس از پرتودرمانی دچار عود مرکزی لگنی شده‌اند یا بیمارانی که در مرحله IVA قرار دارند و امکان دریافت پرتودرمانی برای آنان وجود ندارد. به‌طور کلاسیک، اگزنتراسیون¹⁰ کامل لگنی شامل برداشت رحم، لوله‌های فالوپ، تخمدان‌ها، واژن، مثانه، پیشابراه و رکتوم است. بازسازی پس از این جراحی معمولاً شامل ایجاد مجرای ایلئال یا انحراف ادراری قابل کنترل

¹⁰ Exenteration

برای سیستم ادراری و کولوستومی انتهایی برای سیستم گوارشی است. از جمله روش‌های انحراف ادراری قابل کنترل می‌توان به تکنیک‌های Indiana pouch و Miami pouch اشاره کرد.

در سرطان دهانه رحم، معمولاً اگزنتراسیون کامل انجام می‌شود. با این حال، انواع تعدیل‌شده این روش شامل اگزنتراسیون قدامی و خلفی نیز وجود دارد که در آن‌ها به ترتیب رکتوم یا مثانه حفظ می‌شود. اگزنتراسیون همچنین بر اساس برداشت یا عدم برداشت دیافراگم ادراری - تناسلی و عضلات لواتور^{۱۱} به انواع فوق‌لواتور و زیرلواتور تقسیم می‌شود. پیش از انجام این جراحی، اطمینان از امکان برداشت کامل تومور مرکزی و نبود بیماری متاستاتیک اهمیت اساسی دارد. اگزنتراسیون لگنی با رویکرد کم‌تهاجمی نیز در متون علمی گزارش شده است، اما ارزیابی‌های بیشتری برای تعیین جایگاه قطعی این روش لازم است (۳۲).

در صورت نیاز، می‌توان نئوواژن را با استفاده از فلپ عضلانی - پوستی یا گرافت پوستی با ضخامت نسبی همراه با فلپ J، انتوم ایجاد کرد. رویکرد اگزنتراسیون خلفی فوق‌لواتور این امکان را فراهم می‌کند که در صورت امکان ایجاد آناستوموز کولون، نه تنها عملکرد ادراری، بلکه کنترل دفع مدفوع نیز حفظ شود. میزان بقای پنج‌ساله در بیمارانی که در شرایط عود بیماری تحت اگزنتراسیون قرار می‌گیرند، حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده است. نرخ عود موضعی در سال‌های سوم و پنجم به ترتیب ۸۴ و ۷۵ درصد ذکر شده است. نوع اگزنتراسیون انجام‌شده تأثیر مشخصی بر بقا ندارد (۳۳). مرگ‌ومیر ناشی از این عمل طی ۷۰ سال گذشته به‌طور قابل توجهی کاهش یافته و به کمتر از ۵ درصد رسیده است، اما عوارض جراحی همچنان بیش از ۵۰ درصد گزارش می‌شود. عوارض زودرس شامل عفونت، تشکیل آبسه، ترومبوآمبولی، فیستول، نشت ادرار، پریتونیت، نکروز استوما، نکروز فلپ و بازشدگی استامپ است. عوارض دیررس نیز شامل تنگی استوما، بی‌اختیاری، هیدرونفروز، تشکیل سنگ، درد مزمن و فتق دیواره شکم می‌شود.

سرطان دهانه رحم در بارداری

¹¹ Levator

اگرچه سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌هایی است که در دوران بارداری تشخیص داده می‌شود، اما در بیماران باردار چالش‌های ویژه‌ای از نظر مرحله‌بندی و درمان ایجاد می‌کند. این بیماران باید توسط متخصص طب مادر و جنین ارزیابی شوند تا خطرات احتمالی برای جنین و احتمال از دست رفتن بارداری به‌طور کامل بررسی شود. زنان باردار باید میان خطر به‌تعویق‌انداختن درمان تا پس از زایمان و شروع فوری درمان، تصمیم‌گیری آگاهانه داشته باشند.

تعیین سن بارداری در این شرایط اهمیت بسیار زیادی دارد. حداقل سن بارداری برای بقای جنین حدود ۲۴ هفته در نظر گرفته می‌شود، اما در این سن همچنان خطر قابل توجهی از نظر مرگ نوزادی یا ناتوانی طولانی‌مدت در میان نوزادان زنده‌مانده وجود دارد. بقای بدون ناتوانی در ۲۵ سالگی با افزایش سن بارداری به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد؛ به‌گونه‌ای که این میزان برای نوزادان متولدشده در ۲۲ هفتگی حدود ۴ درصد و برای نوزادان متولدشده در ۲۸ هفتگی حدود ۷۸ درصد گزارش شده است. در مقابل، نوزادان ترم دارای بقای بدون ناتوانی حدود ۹۷ درصد هستند.

اگرچه میزان پرتوی دریافتی در PET یا CT scan معمولاً بسیار کمتر از آستانه ایجاد ناهنجاری‌های مادرزادی و از دست رفتن بارداری است، استفاده از تصویربرداری‌های دارای اشعه یونیزان در این جمعیت باید تا حد امکان محدود شود. در موارد مناسب، روش‌هایی مانند سونوگرافی و MRI برای تعیین گسترش موضعی تومور و بررسی متاستازهای دوردست ترجیح داده می‌شوند. با این حال، MRI و سونوگرافی در تشخیص متاستازهای کوچک غدد لنفاوی حساسیت پایینی دارند؛ بنابراین، در برخی موارد ممکن است استفاده از روش‌های تهاجمی‌تر مرحله‌بندی ضرورت پیدا کند.

در بیمارانی که خطر بالای متاستاز غدد لنفاوی دارند، می‌توان برای تعیین مرحله بیماری، لنفادنکتومی لگنی لاپاروسکوپیک انجام داد (۳۴). ایمنی این روش تنها در مجموعه‌های موردی محدود بررسی شده است، اما انجام آن در هر سه‌ماهه بارداری امکان‌پذیر است؛ هرچند انجام آن در مراحل زودتر بارداری ترجیح داده می‌شود. این روش‌ها به‌ویژه زمانی قابل استفاده هستند که تصویربرداری پیشرفته در دسترس نباشد یا

منع مصرف داشته باشد. افزون بر این، سیستم مرحله‌بندی FIGO همچنان استفاده از پروکتوسیگموئیدوسکوپی و سیستوسکوپی را برای مرحله‌بندی موضعی سرطان دهانه رحم مجاز می‌داند. راهبرد درمانی باید برای هر بیمار به‌صورت اختصاصی و در قالب تصمیم‌گیری چندتخصصی با حضور متخصصان انکولوژی پزشکی، رادیوانکولوژی، زنان و زایمان، طب مادر و جنین و انکولوژی زنان تعیین شود. به‌طور کلی، در بارداری‌های کمتر از ۲۲ هفته و در بیماری مرحله IA1، درمان با کونیزاسیون امکان‌پذیر است؛ با این حال، این روش با خطر ۱۵ درصدی خونریزی قابل توجه و سقط خودبه‌خودی همراه است. در بارداری‌های بالاتر از ۲۲ هفته، اگر بیماری در مراحل اولیه باشد، ممکن است بتوان درمان را تا پس از زایمان به تعویق انداخت. بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته‌تر، یعنی بالاتر از مرحله IB1، ممکن است تا زمان زایمان شیمی‌درمانی نئوآدجوانت مبتنی بر پلاتین مانند سیس‌پلاتین/پاکلیتاکسل دریافت کنند و سپس تحت هیسترکتومی رادیکال هم‌زمان با سزارین قرار گیرند. داده‌های محدود نشان می‌دهند که این رژیم برای مادر و جنین نسبتاً ایمن است. مجموعه‌های کوچک بیماران، پاسخ توموری حدود ۷۵ درصد و عود موضعی در حدود ۱۵ درصد بیماران را گزارش کرده‌اند. خطر سمیت جنینی ناشی از این رژیم‌ها به‌طور کامل مشخص نیست، اما عوارض احتمالی می‌تواند شامل سندرم دیسترس تنفسی، ناهنجاری‌های جنینی و بدخیمی‌های دوران کودکی باشد. دستورالعمل‌های بین‌المللی برای درمان و حفظ جنین منتشر شده‌اند (۳۵).

در بیماران دارای متاستاز مستند غدد لنفاوی، پیشرفت بیماری یا ختم بارداری، شروع فوری درمان توصیه می‌شود. اگر بیمار پیش از درمان تصمیم به ختم بارداری بگیرد، توصیه‌های درمان قطعی مشابه بیماران غیرباردار خواهد بود.

انکولوژی پرتودرمانی

پرتودرمانی همچنان یکی از اجزای اصلی درمان سرطان دهانه رحم است. شواهد حاصل از کارآزمایی‌های تصادفی‌سازی‌شده در دهه ۱۹۹۰ و اوایل دهه ۲۰۰۰ جایگاه پرتودرمانی را تقریباً در تمام ابعاد درمان این

سرطان تثبیت کرده‌اند. پرتودرمانی می‌تواند به‌عنوان درمان قطعی یا درمان کمکی، با یا بدون شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین، مورد استفاده قرار گیرد.

پرتودرمانی قطعی

سرطان دهانه رحم در مراحل اولیه

در مراحل اولیه سرطان دهانه رحم، یعنی مراحل IA1 تا IIA1، پرتودرمانی می‌تواند به‌عنوان تنها روش درمانی مورد استفاده قرار گیرد. پرتودرمانی خارجی یا EBRT همراه با تقویت دوز از طریق براکی‌تراپی یا BT، در مقایسه با هیستریکتومی رادیکال، با عوارض کمتر و میزان بقای کلی پنج‌ساله و بیست‌ساله مشابه، به‌ترتیب ۸۳ و ۷۵ درصد، همراه است. برخی مراکز ممکن است پس از شیمی‌پرتودرمانی، در تومورهای حجیم هیستریکتومی کمکی انجام دهند؛ اما بیشتر دستورالعمل‌ها به دلیل میزان بالای عوارض، این روش را توصیه نمی‌کنند. داده‌های جدیدتر نشان می‌دهند که میزان بقا پس از شیمی‌پرتودرمانی و هیستریکتومی کمکی، کمتر از حد مطلوب است.

سرطان دهانه رحم پیشرفته

بیماری‌های موضعی تهاجمی و یا همراه با درگیری غدد لنفاوی، معمولاً با شیمی‌پرتودرمانی هم‌زمان و قطعی مبتنی بر پلاتین درمان می‌شوند و پس از آن تقویت دوز با براکی‌تراپی انجام می‌گیرد. افزودن شیمی‌درمانی به پرتودرمانی قطعی، در مقایسه با پرتودرمانی تنها، موجب بهبود قابل توجه بقای کلی شده است؛ به‌طوری که بقای کلی هشت‌ساله ۶۷ درصد در برابر ۴۱ درصد گزارش شده است. همچنین بهبودهایی در عود موضعی و متاستاز دوردست نیز مشاهده شده است (۳۶).

پرتودرمانی پس از جراحی

در شرایط پس از جراحی، در صورت وجود برخی یافته‌های پاتولوژیک خاص که نشان‌دهنده افزایش خطر عود هستند، پرتودرمانی با یا بدون شیمی‌درمانی توصیه می‌شود.

به‌طور سنتی، معیارهای Sedlis برای تصمیم‌گیری درباره پرتودرمانی کمکی بدون شیمی‌درمانی در بیماران پس از هیستریکتومی رادیکال به کار می‌رفت. بر اساس این معیارها، وجود حداقل دو مورد از سه ویژگی زیر مطرح بود: اندازه تومور بیش از ۴ سانتی‌متر، وجود تهاجم لنفاوی - عروقی یا LVI، و درگیری بیش از یک سوم استرومای دهانه رحم. هدف این معیارها شناسایی بیمارانی بود که خطر عود سه‌ساله آنان حداقل ۳۰ درصد است. بیمارانی که این معیارها را داشتند و با پرتودرمانی لگنی درمان شدند، بقای بدون پیشرفت بهتر، ۷۸ درصد در برابر ۶۵ درصد، و عود موضعی کمتر، ۱۴ درصد در برابر ۲۱ درصد، نشان دادند. اخیراً نگرانی‌هایی مطرح شده است که این معیارها به دلیل آستانه نسبتاً بالا، ممکن است برخی زنانی را که از پرتودرمانی کمکی سود می‌برند، شناسایی نکند. به همین دلیل، نوموگرامی بر اساس معیارهای اصلی Sedlis و نوع بافت‌شناسی تومور طراحی شده است تا ارزیابی خطر به‌صورت پیوسته‌تر و خطی‌تر انجام شود، نه صرفاً بر اساس یک آستانه ساده.

به‌طور کلاسیک، افزودن شیمی‌درمانی به پرتودرمانی بر اساس کارآزمایی Peters هدایت می‌شد. در این مطالعه، بیماران دارای غدد لنفاوی مثبت، درگیری پارامتریوم یا حاشیه جراحی مثبت به پرتودرمانی تنها یا پرتودرمانی همراه با شیمی‌درمانی هم‌زمان مبتنی بر پلاتین تخصیص یافتند. افزودن شیمی‌درمانی موجب بهبود ۱۰ درصدی بقای کلی در چهار سال و تقریباً ۲۰ درصد بهبود در بقای بدون پیشرفت در همان بازه زمانی شد (۳۷). مطالعات جدیدتر مانند کارآزمایی STARS تلاش کرده‌اند کاربرد شیمی‌درمانی در شرایط کمکی را در بیمارانی که معیارهای Sedlis یا Peters را دارند، گسترش دهند.

تکنیک‌های ارائه پرتودرمانی

دو روش اصلی پرتودرمانی شامل پرتودرمانی خارجی یا EBRT¹²، که به سمت تومور اولیه و لنفاتیک‌های لگنی هدایت می‌شود، و براکی‌تراپی یا BT¹³ است که در آن منبع پرتوزای بسته در نزدیکی تومور قرار داده می‌شود.¹²

پرتودرمانی خارجی یا EBRT

روش‌های EBRT شامل پرتودرمانی سه‌بعدی تطبیقی یا ۳D-CRT و پرتودرمانی با شدت تعدیل‌شده IMRT¹⁴ هستند. در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم با رحم سالم، می‌توان از طرح‌های درمانی اختصاصی استفاده کرد. کاهش عوارض گوارشی و خونی با IMRT، هم در شرایط درمان کمکی و هم درمان قطعی، گزارش شده است.

شبیه‌سازی EBRT

بیمارانی که تحت EBRT قرار می‌گیرند، می‌توانند در وضعیت طاق‌باز قرار داده شوند. هنگام استفاده از IMRT، در نظر گرفتن حرکت دهانه رحم ضروری است. این کار با انجام دو اسکن جداگانه از بیمار انجام می‌شود؛ ابتدا با مثانه پر و سپس با مثانه خالی. قرار دادن بیمار در وضعیت دمر نیز با استفاده از belly board امکان‌پذیر است؛ با این حال، اگر تغییرات روزانه در موقعیت فراکشن‌ها زیاد باشد، اجرای IMRT ممکن است تکرارپذیری کافی نداشته باشد. وضعیت دمر می‌تواند هنگام استفاده از IMRT موجب کاهش دوز دریافتی روده باریک شود (۳۸).

تعیین حجم هدف در EBRT

در گذشته، میدان‌های لگنی بر اساس رادیوگرافی‌های دوبعدی طراحی می‌شدند و شامل میدان‌های قدامی - خلفی، خلفی - قدامی و میدان‌های لترال مقابل هم بودند که در مجموع جعبه چهارمیدانی را تشکیل می‌دادند. لبه فوقانی میدان در پایین مهره L4 و لبه تحتانی آن در پایین سوراخ اوبتوراتور، یا حداقل ۳

¹² External beam radiotherapy

¹³ Brachytherapy

¹⁴ Intensity-modulate radiotherapy

سانتی‌متر پایین‌تر از پایین‌ترین حد بیماری، تعیین می‌شد. میدان‌های لترال نیز همین حدود فوقانی و تحتانی را داشتند؛ مرز قدامی آن‌ها سمفیز پوبیس قدامی و مرز خلفی آن‌ها حفره ساکرال شامل S2 بود. در عصر برنامه‌ریزی مبتنی بر CT، تلفیق PET/CT و IMRT، تعیین دقیق‌تر بیماری قابل مشاهده و حجم‌های انتخابی امکان‌پذیر شده است. حجم تومور قابل مشاهده یا GTV شامل بیماری آشکار در CT، PET و معاینه فیزیکی است. حجم هدف داخلی یا ITV تغییرات ناشی از پر و خالی شدن مثانه را در نظر می‌گیرد و در صورت استفاده از آن، بیمار باید دو شبیه‌سازی CT با مثانه خالی و پر داشته باشد. گسترش حجم تومور بالینی اول یا CTV1 شامل تمام دهانه رحم و رحم در صورت باقی بودن آن است. حجم هدف برنامه‌ریزی شده اول یا PTV1 برای بیماری اولیه معمولاً ۱,۵ سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود CTV2. شامل بافت پارامتریال، بافت‌های پاراواژینال و حداقل نیمه فوقانی واژن است. در صورت درگیری واژن، باید پوشش کل واژن مدنظر قرار گیرد. گسترش PTV2 معمولاً ۱ سانتی‌متر است. حجم‌های انتخابی غدد لنفاوی در CTV3 باید شامل غدد اوبتوراتور، ایلپاک خارجی، ایلپاک داخلی و پره‌ساکرال باشد. در صورت درگیری قسمت تحتانی واژن، پوشش غدد لنفاوی اینگوینال نیز باید مدنظر قرار گیرد. گسترش PTV در غدد انتخابی معمولاً ۰,۷ سانتی‌متر است.

پوشش غدد لنفاوی پارائورت ممکن است در مواردی لازم باشد که شواهدی از بیماری در زنجیره غدد لنفاوی وجود دارد یا زمانی که بیمار دارای گره لگنی مثبت است و درمان سیستمیک دریافت نخواهد کرد. در این شرایط، مرز فوقانی میدان تا فضای بین T12/L1 امتداد می‌یابد و نوار غدد لنفاوی در بالای میدان لگنی، یعنی L5/S1، خاتمه پیدا می‌کند.

دوز EBRT و محدودیت‌های دوز

دوز استاندارد کل لگن ۴۵ تا ۵۰,۴ گری است که معمولاً در فراکشن‌های ۱,۸ تا ۲ گری تجویز می‌شود. در صورت وجود بیماری آشکار غدد لنفاوی، در صورت امکان و بدون عبور از محدودیت دوز اندام‌های در معرض خطر یا OAR، دوز آن می‌تواند تا ۶۰ گری افزایش یابد.

EBRT با پذیرش IMRT پیشرفت قابل توجهی داشته است؛ به طوری که سمیت حاد کاهش یافته و در عین حال پیامدهای انکولوژیک حفظ شده‌اند. اندام‌های معمول در معرض خطر شامل رکتوم، مثانه، روده، سر استخوان‌های فمور و مغز استخوان هستند. محدودیت‌های دوز ارائه شده در QUANTEC می‌توانند راهنمای مناسبی باشند. معمولاً دوزهای ۴۵ تا ۵۰ گری در EBRT به تنهایی موجب میزان قابل توجهی از سمیت حاد مثانه یا روده نمی‌شوند.

اگر براکی‌تراپی برنامه‌ریزی شده باشد، کاهش دوز دریافتی اندام‌های در معرض خطر در مرحله EBRT این امکان را فراهم می‌کند که در مرحله تقویت دوز، دوز بیشتری به تومور داده شود. سرکوب مغز استخوان منجر به نوتروپنی درجه ۳ تا ۴، با پرتودرمانی هدایت‌شده با تصویر و IMRT به طور قابل توجهی کمتر گزارش شده است؛ ۸٫۶ درصد در برابر ۲۷٫۱ درصد. شایع‌ترین محدودیت‌های دوز مربوط به مغز استخوان لگن هستند (۳۹).

براکي‌تراپی یا BT

براکي‌تراپی می‌تواند به تنهایی در سرطان دهانه رحم مراحل اولیه یا به عنوان تقویت دوز پس از EBRT در بیماری‌های پیشرفته‌تر، یعنی مراحل IB2 تا IVA، مورد استفاده قرار گیرد. این روش امکان ارائه دوز بسیار تطبیقی به تومور را فراهم می‌کند و در عین حال تماس با بافت‌های طبیعی را کاهش می‌دهد. دوزدهی از طریق تنظیم مدت زمان توقف منبع پرتوزا در دستگاه اعمال‌کننده کنترل می‌شود. براکی‌تراپی با نرخ دوز بالا یا HDR، با دوز بیش از ۱۲ گری در ساعت، شایع‌ترین تکنیک مورد استفاده است؛ هرچند به یک منبع رادیواکتیو، معمولاً ایریدیوم-۱۹۲، نیاز دارد.

براکي‌تراپی معمولاً پس از پایان بخش پرتودرمانی خارجی یا هم‌پوشان با EBRT در هفته آخر درمان آغاز می‌شود EBRT و BT نباید در یک روز انجام شوند. کل زمان درمان، شامل EBRT و BT، نباید از ۸ هفته فراتر رود. طولانی شدن بیش از حد زمان درمان می‌تواند به کاهش روزانه حدود ۱ درصد در کنترل موضعی و بقای کلی منجر شود.

پیش از انجام BT، باید شرح حال بیمار، معاینه فیزیکی، پاتولوژی و تصویربرداری‌ها بازبینی شوند. شمارش کامل سلول‌های خون و پنل متابولیک باید ظرف یک هفته پیش از اقدام انجام شود. اختلالات متابولیک باید پیش از انجام پروسیجر بررسی و اصلاح شوند. بیمارانی که شمارش مطلق نوتروفیل یا ANC کمتر از ۵۰۰ دارند، تا زمان بهبود شمارش سلولی نباید تحت این اقدام قرار گیرند. داروها، به‌ویژه داروهای ضدانعقاد، باید مرور شوند و نتیجه زمان پروترومبین INR/نیز بررسی شود. قطع موقت داروهای ضدانعقاد پیش از اقدام باید با دقت مورد توجه قرار گیرد. در بیماران بستری و محدود به تخت، پیشگیری از ترومبوز و استفاده از وسایل فشاری متوالی توصیه می‌شود. آماده‌سازی روده نیز باید پیش از اقدام با بیمار مرور شود.

اپلیکاتورهای براکی‌تراپی

اپلیکاتورهای مختلفی در سناریوهای بالینی گوناگون قابل استفاده هستند. رایج‌ترین وسیله در سرطان دهانه رحم با رحم سالم، "Tandem and Ring" است. در این روش، تندم داخل کانال سرویکس قرار می‌گیرد و حلقه در فورنیکس‌های واژن جای‌گذاری می‌شود. "Tandem and Ovoids" نیز به‌طور مشابه استفاده می‌شود، اما در بیمارانی که دهانه رحم بشکله‌ای شکل دارند، ترجیح داده می‌شود. اپلیکاتورهای بینابینی مانند قالب Syed در بیمارانی با درگیری وسیع پارامتریوم، درگیری دیواره جانبی لگن، درگیری قسمت تحتانی واژن یا عود در کاف واژن قابل استفاده هستند. "Tandem and Cylinder" در مواردی مانند تنگی واژن، عدم امکان قرار دادن Ring یا Ovoid، یا درگیری قسمت تحتانی واژن با ضخامت کمتر از ۵ میلی‌متر به کار می‌رود. همچنین می‌توان در "Tandem and Ring" یا سیلندر واژینال تغییراتی ایجاد کرد تا امکان استفاده از سوزن‌های بینابینی فراهم شود (۴۰).

ناراحتی بیمار حین انجام پروسیجر می‌تواند به جای‌گذاری نامطلوب اپلیکاتور، طولانی شدن زمان انجام اقدام و ایجاد اضطراب برای بیمار منجر شود. معمولاً برای بهبود راحتی بیمار و کیفیت اجرای پروسیجر، استفاده از بی‌حسی یا بیهوشی لازم است. انواع بیهوشی یا بی‌حسی ممکن است شامل بیهوشی عمومی، بی‌حسی نخاعی، اپیدورال، سدیشن وریدی آگاهانه و داروهای خوراکی ضد درد باشد.

جای‌گذاری اپلیکاتور داخل حفره‌ای در دهانه رحم سالم

بیمار در وضعیت لیتوتومی دورسال قرار داده می‌شود. پس از آماده‌سازی استریل مناسب، کاتتر فولی گذاشته شده و بالون آن با ماده حاجب رقیق پر می‌شود تا در سی تی اسکن قابل شناسایی باشد. سپس اسپکولوم برای مشاهده دهانه رحم وارد می‌شود و از سوند رحمی برای تعیین طول حفره استفاده می‌گردد. این کار به تعیین طول و زاویه مناسب تندم کمک می‌کند. گاهی برای حفظ باز بودن دهانه سرویکس از Smit sleeve استفاده می‌شود، اما در صورت نبود آن، ممکن است دیلاتاسیون‌های متوالی لازم باشد. پس از تکمیل این مرحله، تندم وارد شده و سپس Ring یا Ovoid قرار داده می‌شود. همچنین ممکن است نشانگرهای فیدوشیال در طول پروسیجر برای مشخص کردن وسعت بیماری یا دهانه کانال سرویکس قرار داده شوند تا در سی تی اسکن قابل مشاهده باشند. این اپلیکاتورها می‌توانند قفل شوند تا موقعیت نسبی آنها تغییر نکند.

جابجایی مثانه و رکتوم برای کاهش دوز اضافی و محدود کردن سمیت اهمیت زیادی دارد. مواد پکینگ می‌توانند شامل گاز آغشته به محلول رادیوپاک باشند. اپلیکاتورهای دارای بالون قابل باد شدن یا تیغه‌های جداگانه رکتال نیز در دسترس هستند. پکینگ قدامی مثانه را جابجا می‌کند و پکینگ خلفی رکتوم را دور می‌سازد. باید دقت شود که هیچ پکینگی در مقابل Ring یا Ovoid قرار نگیرد، زیرا این کار به‌طور قابل توجهی دوز مورد نظر را کاهش می‌دهد.

پس از اتمام جای‌گذاری، بیمار برای برنامه‌ریزی سه‌بعدی BT تحت شبیه‌سازی CT قرار می‌گیرد. برنامه‌ریزی سه‌بعدی مبتنی بر CT در مقایسه با برنامه‌ریزی دوبعدی، با بهبود بقای کلی، ۷۴ درصد در برابر ۶۵ درصد، و کاهش سمیت درجه ۳ تا ۴، ۳ درصد در برابر ۲۳ درصد، همراه بوده است. ضخامت برش ۱ تا ۵ میلی‌متر توصیه می‌شود. در سال‌های اخیر، BT هدایت‌شده با MRI نیز برای بهبود تعیین مرز بافت‌ها وارد برنامه‌ریزی درمان شده است؛ این تمایز به‌ویژه در توالی‌های T2-weighted fat-suppressed یا T2-fast-spin echo بهتر دیده می‌شود.

تصاویر پاراکسیال و پاراکرونال نسبت به دهانه رحم - رحم و نیز تصاویر سائیتال باید تهیه شوند (۴۱). این تصاویر همچنین می‌توانند پاسخ به شیمی‌پرتودرمانی را ارزیابی کنند. از نظر فنی، دستگاه‌های MRI با میدان مغناطیسی کم یا زیاد قابل استفاده هستند. برای کاهش حرکت روده، ممکن است پیش از MRI به بیمار گلوکاگون داده شود. استفاده از کویل لگنی برای افزایش نسبت سیگنال به نویز توصیه می‌شود. به‌طور ایده‌آل، ضخامت برش ۳ میلی‌متر باید به دست آید، زیرا به بهبود تشخیص درگیری پارامتریوم کمک می‌کند؛ اما ضخامت کمتر از ۵ میلی‌متر نیز قابل قبول است. معایب این رویکرد شامل هزینه بالاتر، زمان طولانی‌تر پروسیجر و ضرورت سازگاری کامل مواد مورد استفاده با MRI است.

جای‌گذاری صحیح اپلیکاتور باید با رادیوگرافی ساده یا تصویربرداری پیشرفته‌تر مانند CT scan یا MRI تأیید شود. جای‌گذاری مناسب شامل این موارد است: تندم در تصاویر قدامی - خلفی و لترال، ring یا ovoid را به دو نیم تقسیم کند؛ تندم در فاصله یک‌سوم تا یک‌دوم بین پرومونتوریم ساکروم و سمفیز پوبیس قرار گیرد؛ نوک تندم پایین‌تر از پرومونتوریم ساکرال باشد؛ هیچ پکینگی در بالای ring یا ovoid قرار نداشته باشد؛ و ring یا ovoid نسبت به فلنچ به سمت پایین جابجا نشده باشد.

در HDR BT، فناوری remote afterloading این امکان را فراهم می‌کند که یک منبع کوچک ایریدیوم متصل به انتهای کابل به‌صورت رباتیک از مسیرهای متعدد عبور کرده و در نقاط از پیش تعیین‌شده، یعنی dwell positions، برای مدت‌زمان‌های متفاوت متوقف شود. یک مرور کارین تفاوتی میان براکی‌تراپی داخل‌حفره‌ای با نرخ دوز بالا یا HDR و نرخ دوز پایین یا LDR از نظر پیامدهای انکولوژیک نشان نداد. این پیامدها شامل بقای کلی، بقای بدون بیماری، بقای بدون عود، نرخ کنترل موضعی، عود و متاستاز بودند. همچنین تفاوتی در عوارض مرتبط با درمان مشاهده نشد. با وجود این، این مرور استفاده از HDR ICBT را برای تمام مراحل بالینی سرطان دهانه رحم توصیه می‌کند؛ زیرا HDR ICBT مزایایی مانند دقت منبع، جای‌گذاری بهتر اپلیکاتور، امکان درمان سرپایی و راحتی بیشتر بیمار دارد

تعیین حجم هدف در BT

در برنامه‌ریزی سه‌بعدی، کانتورینگ اهداف درمانی اهمیت اساسی دارد. گروه اروپایی کوری‌تراپی و انجمن اروپایی رادیوتراپی و انکولوژی یا GEC-ESTRO اصطلاحات استاندارد برای تعیین حجم هدف ارائه کرده‌اند. حجم هدف بالینی پرخطر یا HR-CTV شامل کل دهانه رحم و تمام بیماری قابل مشاهده در آغاز درمان BT است. حجم هدف بالینی با خطر متوسط یا IR-CTV شامل HR-CTV و بیماری قابل مشاهده پیش از شروع هرگونه درمان است. حجم هدف بالینی کم‌خطر یا LR-CTV نیز شامل IR-CTV به‌همراه کل رحم، بخش فوقانی واژن، کل پارامتریوم و فضاهای بین مثانه و رکتوم است. اندام‌های طبیعی در معرض خطر، شامل مثانه، رکتوم، کولون سیگموئید و واژن، نیز باید کانتور شوند.

دوز BT و محدودیت‌های دوز

اطمینان از دریافت دوز کافی توسط هدف درمانی اهمیت حیاتی دارد و نشان داده شده است که موجب بهبود کنترل موضعی و بقا می‌شود. طرح‌های دوز و فراکشن‌بندی ممکن است بسته به ترجیح مرکز درمانی متفاوت باشند، اما باید در مجموع به دوز معادل در فراکشن‌های ۲ گری یا EQD2 برابر با ۸۵ گری یا بیشتر منجر شوند؛ با این فرض که ابتدا ۴۵ گری به لگن داده شده باشد. ابزارهای محاسبه مختلفی برای تعیین EQD2 وجود دارد. یکی از این ابزارها که به‌طور غیررسمی با عنوان Vienna Spreadsheet شناخته می‌شود، توسط گروه کارآزمایی EMBRACE استفاده شد و محاسبات EQD2 را برای ساختارهای هدف و اندام‌های در معرض خطر فراهم می‌کند. رایج‌ترین طرح‌های فراکشن‌بندی شامل ۴ نوبت ۷ گری، ۵ نوبت ۶ گری و ۶ نوبت ۵ گری هستند که به‌ترتیب EQD2 تقریبی ۹۰، ۸۸، ۶ و ۸۳، ۷ گری ایجاد می‌کنند.

در برنامه‌ریزی سه‌بعدی، پارامتر دوزیمتری مهم D90 برابر یا بیشتر از ۹۰ درصد است. هدف آن است که ۹۰ درصد از HR-CTV حداقل ۹۰ درصد دوز تجویزی را دریافت کند EQD2. باید محاسبه شود تا اطمینان حاصل گردد که دوز کل دریافتی حدود ۸۵ گری یا بیشتر است؛ هرچند در برخی موارد، EQD2

اندکی کمتر نیز قابل قبول است. در بیمارانی که پیش از BT پاسخ کامل داشته‌اند یا پاسخ نسبی همراه با باقی‌ماندن بیماری کمتر از ۴ سانتی‌متر دارند، EQD2 بالاتر از ۸۰ گری قابل استفاده است؛ اما در بیمارانی که بیماری باقی‌مانده بیش از ۴ سانتی‌متر دارند، EQD2 بیش از ۸۵ گری توصیه می‌شود.

با وجود گذار به برنامه‌ریزی حجمی سه‌بعدی و تکامل مداوم درمان BT، نظام‌های گزارش‌دهی دوزیمتری دوبعدی همچنان وجود دارند و آشنایی با آن‌ها ضروری است. نقطه A، یعنی محل عبور شریان رحمی از روی حالب، در فاصله ۲ سانتی‌متر بالاتر از تندم و ۲ سانتی‌متر لترال نسبت به تندم قرار دارد و در ابتدا بخشی از سیستم Manchester بود. این نقطه در گذشته محل تجویز دوز محسوب می‌شد، اما امروزه بیشتر به‌عنوان نقطه شروع در نظر گرفته می‌شود که می‌توان پوشش دوز را در سه‌بعد برای اطمینان از پوشش HR-CTV تنظیم کرد. نقطه B نیز بخشی از سیستم Manchester بود و در فاصله ۲ سانتی‌متر بالاتر از تندم و ۵ سانتی‌متر از خط میانی بیمار قرار دارد. این نقطه نماینده لنفاتیک‌های دیواره جانبی لگن است و معمولاً یک‌سوم دوز تجویزی را دریافت می‌کرد؛ اما اکنون کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد و دیگر به‌طور معمول گزارش نمی‌شود. خطوط ایزودوز در ایمپلنت‌های معمول Tandem و Ring/Ovoid باید به شکل گلابی باشند. افزون بر این، کمیسیون بین‌المللی واحدها و اندازه‌گیری‌های پرتویی یا ICRU 38 نقاطی را برای مثانه و رکتوم مشخص کرده است. نقطه مثانه در پشت بالون فولی قرار دارد که به سمت گردن مثانه کشیده شده است. نقطه رکتوم نیز ۵ میلی‌متر پشت دیواره واژن قرار می‌گیرد.

دوزهای دریافتی اندام‌های در معرض خطر نیز باید با دقت ثبت شوند. در اینجا نیز دوز تجمعی EQD2 اهمیت اصلی دارد. پارامتر دوزیمتری D2cc که نشان‌دهنده بالاترین دوز دریافتی توسط ۲ سانتی‌متر مکعب بافت است، معمولاً برای ارزیابی طرح BT استفاده می‌شود. دستورالعمل‌های انجمن براکی‌تراپی آمریکا یا ABS اجازه می‌دهند D2cc مثانه تا ۹۰ گری یا کمتر EQD2 باشد، در حالی که D2cc رکتوم

و سیگموتید باید ۷۵ گری یا کمتر EQD2 باشد. با این حال، داده‌های جدیدتر نشان می‌دهند که عوارض دیررس رکتوم ممکن است حتی با D2cc برابر ۶۵ گری یا کمتر نیز به‌طور قابل توجهی کاهش یابد (۴۳).

عوارض پرتودرمانی

سمیت طولانی‌مدت در هر بیماری که پرتودرمانی دریافت می‌کند، یک نگرانی مهم است. عوارض روده‌ای، رکتال و ادراری از شایع‌ترین عوارض هستند. به نظر نمی‌رسد که فراوانی یا شدت عوارض ارتباط مشخصی با سن داشته باشد. بیشترین خطر پیامدهای دیررس معمولاً طی سه سال نخست پس از درمان رخ می‌دهد.

پروکتیت

پروکتیت ناشی از پرتودرمانی می‌تواند موجب تنسموس و خونریزی متناوب هنگام دفع شود. پروکتیت پس از پرتودرمانی معمولاً زودتر از سه ماه پس از درمان رخ نمی‌دهد، اما ممکن است سال‌ها بعد ایجاد شود. درمان‌ها می‌توانند شامل شیاف‌های مزالامین یا استروئیدی برای کاهش درد و کنترل خونریزی باشند. کارآزمایی‌های تصادفی‌شده نشان داده‌اند که مزالامین ممکن است اندکی مؤثرتر از شیاف‌های استروئیدی باشد. سایر درمان‌ها شامل کاربرد فرمالدهید ۴ درصد برای کنترل خونریزی رکتال است. در موارد مقاوم، می‌توان از انعقاد با لیزر آرگون پلاسما روی عروق مسئول خونریزی استفاده کرد.

سیستیت

سیستیت ناشی از پرتودرمانی می‌تواند باعث دیزوری، تکرر ادرار و در برخی موارد هم‌اچوری شود. این عارضه ممکن است به‌صورت حاد طی ۲ تا ۳ هفته پس از آغاز پرتودرمانی رخ دهد و تا سه سال پس از درمان نیز مشاهده شود.

در سیستیت حاد، ابتدا باید عفونت ادراری رد شود؛ بنابراین آزمایش کامل ادرار گام مناسبی برای شروع تشخیص است. برای کاهش دیزوری می‌توان دوره کوتاهی از فنازوپیریدین تجویز کرد، هرچند تغییر رنگ ادرار ممکن است برای برخی بیماران نگران‌کننده باشد و باید پیش از شروع دارو به بیمار توضیح داده شود.

تکرار ادرار را می‌توان با داروهای آنتی‌کولینرژیک مانند اکسی‌بوتینین یا میرابگرون درمان کرد، اما در بیماران سالمند باید احتیاط شود.

بروز سیستیت مزمن حدود ۵ تا ۱۰ درصد گزارش شده است. این بیماران علاوه بر تکرر و دیزوری، بیشتر دچار هماچوری می‌شوند. شدت بیماری می‌تواند از خفیف تا شدید و تهدیدکننده حیات متغیر باشد. بیماران با علائم خفیف ممکن است به‌صورت محافظه‌کارانه مدیریت شوند. داروهای ضدپلاکت یا ضدانعقاد مصرفی بیمار باید بازبینی شده و ضرورت ادامه آن‌ها ارزیابی شود. در موارد شدیدتر، سیستوسکوپی همراه با تخلیه لخته و شست‌وشو ضروری است. طی سیستوسکوپی، می‌توان برای کنترل هماچوری مقاوم از تزریق فرمالین استفاده کرد. در موارد مقاوم، اکسیژن‌درمانی پرفشار استفاده شده و در ۹۲ درصد بیماران موجب کاهش و کنترل خونریزی شده است؛ با این حال، احتمال عود وجود دارد. باروتروما یکی از خطرات مرتبط با این روش است.

بدخیمی ثانویه

سرطان‌های ناشی از پرتودرمانی معمولاً چند دهه پس از درمان ظاهر می‌شوند. خطر کلی بدخیمی ثانویه در بیمارانی که پرتودرمانی لگنی دریافت کرده‌اند، در مقایسه با بیمارانی که فقط با جراحی درمان شده‌اند، افزایش می‌یابد. در زنان کمتر از ۵۰ سال، خطر تجمعی ۴۰ ساله ۲۲ درصد گزارش شده است، در حالی که این میزان در زنان بالاتر از ۵۰ سال ۱۶ درصد بوده است. سرطان‌های ثانویه معمولاً محدود به رکتوم، مثانه، ریه‌ها و دستگاه تناسلی هستند. مطالعات گذشته‌نگر دیگر نیز افزایش خطر لوسمی را نشان داده‌اند که معمولاً ۵ تا ۱۰ سال پس از درمان به اوج می‌رسد (۴۴). محدود کردن دوز دریافتی اندام‌های طبیعی می‌تواند به کاهش این خطر کمک کند.

نارسایی تخمدان

نارسایی تخمدان ناشی از پرتودرمانی معمولاً طی ۶ تا ۱۲ ماه پس از پرتودرمانی رخ می‌دهد. حداقل دوز لازم برای ایجاد نارسایی تخمدان با سن رابطه معکوس دارد و از ۲۰,۳ گری در زمان تولد تا ۱۴,۳ گری در سن ۳۰ سالگی متغیر است. دوزهایی که برای درمان سرطان دهانه رحم استفاده می‌شوند، به‌راحتی می‌توانند موجب نارسایی تخمدان شوند. بیماران پیش از یائسگی گزینه‌هایی برای حفظ عملکرد تخمدان دارند؛ از جمله جراحی قطعی یا جابه‌جایی تخمدان. جابه‌جایی لاپاروسکوپیک تخمدان امکان قرار دادن تخمدان‌ها در خارج از میدان پرتودرمانی، معمولاً در فاصله ۳ سانتی‌متری، را فراهم می‌کند. این روش برای حفظ باروری نیز مفید است. میزان حفظ عملکرد تخمدان حدود ۸۰ درصد گزارش شده است. کرایوپرزرویشن تخمدان نیز گزینه دیگری است. همچنین برای پیشگیری از پوکی استخوان و استئوپنی و حفظ میل جنسی، باید تجویز هورمون خارجی استروژن مدنظر قرار گیرد.

تنگی واژن

تنگی واژن و کوتاه شدن کانال واژن می‌تواند طی ماه‌ها تا سال‌ها پس از درمان ایجاد شود. تنگی ممکن است انجام رابطه جنسی و معاینه زنان را دشوار کند. استفاده منظم از دیلاتور واژینال معمولاً توصیه می‌شود، اما میزان پایداری بیماران بسیار متغیر است. اختلال عملکرد جنسی نیز شایع است و می‌تواند از کاهش میل جنسی تا کاهش کافی لغزندگی واژن متغیر باشد.

شکستگی استخوان

پرتودرمانی لگنی می‌تواند خطر شکستگی‌های لگنی را افزایش دهد و بیشتر شکستگی‌ها در سطوح دوز ۴۵ تا ۶۳ گری رخ می‌دهند. سلامت استخوان در بیمارانی که پرتودرمانی لگنی دریافت می‌کنند، یکی دیگر از نگرانی‌های مهم است. حدود ۱۰ درصد بیمارانی که به دلیل سرطان دهانه رحم پرتودرمانی می‌شوند، دچار

شکستگی لگنی می‌گردند. شایع‌ترین محل شکستگی، ساکروم است و بیشتر موارد طی دو سال پس از درمان رخ می‌دهد. انجام سنجش تراکم استخوان و مداخلات مناسب برای حفظ سلامت استخوان می‌تواند به کاهش این خطر کمک کند.

سوراخ‌شدگی رحم

سوراخ‌شدگی رحم یکی از عوارض مرتبط با جای‌گذاری اپلیکاتور BT است و می‌تواند به دریافت دوز بیش از حد توسط بافت‌های طبیعی، پوشش ناکافی هدف درمانی، خونریزی و عفونت منجر شود. میزان سوراخ‌شدگی بین ۲ تا ۱۸ درصد گزارش شده است. مدیریت این عارضه بحث‌برانگیز است و می‌تواند از به‌تعویق‌انداختن BT برای فرصت دادن به ترمیم تا کنار گذاشتن کامل پروسیجر متغیر باشد. با این حال، تأخیر در درمان می‌تواند پیامدهای بیمار را به‌طور نامطلوب تحت تأثیر قرار دهد. خطر آسیب عروقی و اندامی زمانی که سوراخ‌شدگی با وسیله کند ایجاد شده باشد، پایین است. بیماران پایدار و بدون علائم عفونت می‌توانند ترخیص شده و تحت نظر قرار گیرند. ممکن است آنتی‌بیوتیک پروفیلاکتیک تجویز شود. وجود نشانه‌های ناپایداری همودینامیک و عفونت، نیازمند رویکرد تهاجمی‌تر شامل مایعات وریدی، آنتی‌بیوتیک و اکتشاف جراحی است.

انکولوژی پزشکی

درمان قطعی

کارآزمایی‌های گروه انکولوژی پرتودرمانی یا RTOG کاربرد رژیم‌های شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین را تثبیت کرده‌اند. در مقایسه با پرتودرمانی تنها، این رژیم‌ها به‌طور پایدار با بهبود بقای کلی، بقای بدون بیماری و کنترل موضعی همراه بوده‌اند. فرض بر این است که شیمی‌درمانی به‌عنوان حساس‌کننده به پرتو عمل می‌کند. شایع‌ترین داروی مورد استفاده، سیس‌پلاتین هفتگی است. رژیم‌های تک‌دارویی مبتنی بر پلاتین در مقایسه با رژیم‌های غیرپلاتینی، بهترین بقای بدون پیشرفت و بقای کلی را نشان داده‌اند و نسبت به ترکیب‌های مبتنی بر پلاتین مانند سیس‌پلاتین/FU-۵-هیدروکسی‌اوره، پروفایل سمیت مطلوب‌تری دارند.

(۴۵). در بیمارانی که تحمل سیس پلاتین را ندارند، کاربوپلاتین نیز قابل استفاده است. برخی مراکز همچنان از ترکیب سیس پلاتین/۵-FU استفاده می کنند. این رژیم همزمان با پرتودرمانی تجویز می شود.

درمان کمکی

در صورتی که بیمار پس از برداشت جراحی دارای ویژگی های پرخطر باشد، می توان شیمی پرتودرمانی را به درمان اضافه کرد. در برخی بیماران پرخطر پس از جراحی، افزودن شیمی درمانی به پرتودرمانی با بهبود بقای کلی و بقای بدون پیشرفت همراه بوده است.

استفاده از شیمی درمانی کمکی پس از شیمی پرتودرمانی قطعی همچنان در کارآزمایی های بالینی در حال بررسی است و نتایج تاکنون متفاوت بوده اند. افزودن کاربوپلاتین/تاکسول کمکی به شیمی پرتودرمانی در سرطان دهانه رحم موضعاً پیشرفته، با افزایش سمیت درجه ۳ تا ۵ همراه بود و تفاوتی در بقای کلی یا بقای بدون پیشرفت ایجاد نکرد. در کارآزمایی دیگری که از سیس پلاتین/جمسیتابین همزمان و کمکی استفاده شد، بقای بدون پیشرفت سه ساله بهبود یافت، اما میزان سمیت درجه ۳ تا ۴ و بستری شدن به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. کارآزمایی RTOG 0724 نیز در حال بررسی استفاده از سیس پلاتین/پاکلیتاکسل کمکی پس از شیمی پرتودرمانی قطعی در بیماران پرخطر پس از جراحی است.

عود و متاستاز

در بیماری عودکرده یا متاستاتیک، بیمارانی که کاندید جراحی اگزنتراسیون یا پرتودرمانی نیستند، ممکن است فقط درمان سیستمیک دریافت کنند. بسیاری از بیماران پیش تر درمان تک دارویی مبتنی بر سیس پلاتین دریافت کرده اند؛ بنابراین معمولاً از رژیم های چنددارویی استفاده می شود. ترکیب سیس پلاتین/پاکلیتاکسل در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم عودکرده موجب بهبود بقای بدون پیشرفت شده است، اما تفاوتی در میانه بقای کلی ایجاد نکرده است. هرچند ترکیب های دارویی دیگری مانند سیس پلاتین/توپوتکان، سیس پلاتین/جمسیتابین و سیس پلاتین/وینورلبن نیز گزینه های بالقوه هستند،

گروه انکولوژی زنان یا GOG در پروتکل ۲۰۴ نشان داده است که این رژیم‌ها نسبت به سیس‌پلاتین/پاکلیتاکسل برتری ندارند.

افزودن عوامل زیستی مانند آنتاگونیست‌های گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، از جمله بواسیزوماب، به رژیم‌های استاندارد شیمی‌درمانی موجب بهبود بقای کلی شده است. ایمونوتراپی با مهار PD-1 نیز وارد رژیم‌های شیمی‌درمانی شده است. پمبرولیزوماب به‌صورت تک‌دارویی در بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم عودکرده یا متاستاتیک، نرخ پاسخ عینی ۱۲ تا ۱۴ درصد داشته است. مطالعه Keynote-826، به‌عنوان یک کارآزمایی فاز ۳ تصادفی‌سازی‌شده و دوسوکور، نشان داد که افزودن پمبرولیزوماب به شیمی‌درمانی چنددارویی موجب بهبود بقای کلی و بقای بدون پیشرفت می‌شود (۴۶). تحلیل‌های زیرگروهی بعدی نیز این یافته را در جمعیت ژاپنی تأیید کردند.

عوارض درمان سیستمیک

شایع‌ترین داروهای مبتنی بر پلاتین مورد استفاده، سیس‌پلاتین و کاربوپلاتین هستند. عوارض شایع این داروها شامل نوتروپنی، ترومبوسیتوپنی، کم‌خونی، نوتروپنی تب‌دار، سمیت کلیوی، سمیت عصبی و عفونت است. اگرچه سیس‌پلاتین داروی انتخابی محسوب می‌شود، کاربوپلاتین در بیمارانی که احتمال تحمل پایین‌تری نسبت به سیس‌پلاتین دارند، به‌ویژه در صورت وجود بیماری زمینه‌ای کلیه، قابل استفاده است. تصور می‌شود کاربوپلاتین اثربخشی کمتری نسبت به سیس‌پلاتین داشته باشد؛ با این حال، داده‌های آینده‌نگر نشان داده‌اند که از نظر اثربخشی، عدم‌برتری^۹ دارد و در عین حال با کاهش معنی‌دار نوتروپنی تب‌دار و غیرتب‌دار و افزایش کراتینین همراه است.

^۹ noninferiority

بواسیزوماب با خطر پرفشاری خون، خونریزی، رویدادهای ترومبوآمبولیک، آسیب کلیوی و نارسایی تخمدان در زنان پیش از یائسگی همراه است. پمبرولیزوماب نیز می‌تواند پدیده‌های خودایمنی مانند پنومونیت، کولیت، هپاتیت، نفریت و اختلالات غدد درون‌ریز را ایجاد کند.

۹-۱-۱-۲، مرحله‌بندی

سیستم مرحله‌بندی «فدراسیون بین‌المللی زنان و زایمان» یا FIGO در سال ۲۰۱۸ به‌روزرسانی شد و همچنان روش غالب برای مرحله‌بندی سرطان دهانه رحم محسوب می‌شود. ویرایش هشتم راهنمای مرحله‌بندی «کمیته مشترک سرطان آمریکا» یا AJCC نیز دارای سیستم طبقه‌بندی تومور، گره لنفاوی و متاستاز یا TNM است که مراحل تومور در آن با مراحل FIGO تطابق دارد؛ با این حال، این سیستم به‌طور معمول در سرطان دهانه رحم کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مرحله‌بندی FIGO

در گذشته، مرحله‌بندی FIGO عمدتاً بر اساس معاینه بالینی، سیستوسکوپی، پروکتوسکوپی، هیستروسکوپی، اوروگرافی و رادیوگرافی ساده انجام می‌شد. استفاده از این آزمون‌های نسبتاً پایه به این دلیل بود که کشورهای در حال توسعه و مناطق دارای منابع محدود نیز بتوانند بیماران را به شکل قابل قبول مرحله‌بندی کنند. در سال‌های اخیر، روش‌های تصویربرداری پیشرفته‌تر مانند MRI و PET scan نیز وارد فرایند مرحله‌بندی شده‌اند. برای تعیین مرحله تومور، MRI به دلیل قدرت بهتر در افتراق بافتی نسبت به CT scan همراه با ماده حاجب، روش ترجیحی محسوب می‌شود.

مرحله I

در این مرحله، بیماری به‌طور کامل محدود به دهانه رحم است. تقسیم‌بندی A و B در این مرحله بر اساس عمق تهاجم انجام می‌شود؛ به‌طوری‌که تهاجم برابر یا کمتر از ۵ میلی‌متر در برابر تهاجم بیش از ۵ میلی‌متر تفکیک می‌گردد.

مرحله II

در مرحله II، بیماری از رحم فراتر رفته است، اما هنوز به بخش تحتانی واژن گسترش نیافته است. این مرحله نیز بر اساس درگیری یا عدم درگیری پارامتریوم به زیرگروه‌های A و B تقسیم می‌شود.

مرحله III

در مرحله III، بیماری به یک‌سوم تحتانی واژن گسترش یافته است که به‌عنوان مرحله IIIA در نظر گرفته می‌شود، یا به دیواره جانبی لگن رسیده و یا با هیدرونفروز همراه شده است که در مرحله IIIB قرار می‌گیرد. در گذشته، درگیری غدد لنفاوی در سیستم مرحله‌بندی FIGO تأثیری نداشت؛ با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که درگیری غدد لنفاوی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های پیش‌آگهی در کاهش بقای کلی پنج‌ساله است (۴۷). بر همین اساس، مراحل جدید IIC1 و IIC2 به سیستم مرحله‌بندی افزوده شدند که به‌ترتیب نشان‌دهنده درگیری غدد لنفاوی لگنی و غدد لنفاوی پارائورت هستند.

مرحله IVA

در مرحله IVA، بیماری از نظر موضعی تهاجمی است و اندام‌های مجاور مانند مثانه یا رکتوم را درگیر کرده است.

مرحله IVB

در مرحله IVB، بیماری به سایر اندام‌های جامد دوردست گسترش یافته است. این مرحله همچنین می‌تواند نشان‌دهنده درگیری غدد لنفاوی غیرناحیه‌ای باشد.

۲-۱-۱۰، پیش‌آگهی

عوامل متعددی در تفاوت پیامدهای بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نقش دارند. از جمله عوامل بالقوه مؤثر بر پیش‌آگهی می‌توان به مرحله بیماری، تعداد غدد لنفاوی برداشت‌شده، استفاده از مانیپولاتور رحمی

در جراحی لاپاروسکوپیک، سن، نژاد، قومیت، وضعیت عمومی سلامت پیش از تشخیص و میزان دسترسی به مراقبت‌های مبتنی بر شواهد اشاره کرد. این عوامل پیش‌آگهی‌دهنده نشان می‌دهند که فرصت‌هایی برای بهبود کیفیت مراقبت و کاهش مرگ‌ومیر کلی بیماران وجود دارد.

در صورت تشخیص زودهنگام، میزان بقای نسبی پنج‌ساله سرطان دهانه رحم حدود ۹۲ درصد است. حدود ۴۴ درصد بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم در مرحله اولیه تشخیص داده می‌شوند. غربالگری نامنظم، یک عامل خطر مستقل برای تشخیص دیرهنگام محسوب می‌شود. هرچه مرحله بیماری در زمان تشخیص بالاتر باشد، میزان بقا کاهش یافته و احتمال عود افزایش می‌یابد. زمانی که سرطان دهانه رحم پس از گسترش موضعی یا انتشار به غدد لنفاوی ناحیه‌ای تشخیص داده شود، میزان بقای نسبی پنج‌ساله به ۶۰ درصد کاهش می‌یابد. در صورت وجود متاستاز دوردست در زمان تشخیص، میزان بقای نسبی پنج‌ساله حدود ۱۹ درصد گزارش شده است.

مطالعات نشان داده‌اند که برخی عوامل مرتبط با جراحی نیز بر بقا اثر می‌گذارند. تصور می‌شود تعداد غدد لنفاوی برداشت‌شده تا حدی نشان‌دهنده کامل‌تر بودن درمان جراحی باشد. پژوهش‌ها بیانگر آن هستند که تعداد بیشتر غدد لنفاوی برداشت‌شده، اثر مثبت و معنی‌داری بر بقای بدون پیشرفت بیماری دارد. در زنانی که تحت جراحی لاپاروسکوپیک قرار می‌گیرند، استفاده از مانیپولاتور رحمی با پیش‌آگهی بهتر همراه گزارش شده است.

میزان بقا بر اساس نژاد نیز متفاوت است. میزان بقای نسبی پنج‌ساله در زنان از تمام نژادها حدود ۶۷ درصد گزارش شده است. زنان سیاه‌پوست معمولاً بالاترین میزان مرگ‌ومیر و پایین‌ترین میزان بقا را دارند؛ به‌طوری‌که بقای نسبی پنج‌ساله در این گروه حدود ۵۶ درصد گزارش شده است (۴۸).

سن بیمار در زمان تشخیص نیز، مستقل از مرحله بیماری و نوع بافت‌شناسی، در تفاوت پیش‌آگهی و بقا نقش دارد. افزایش سن با کاهش میزان بقا همراه است. میزان بقای نسبی پنج‌ساله در بیماران کمتر از ۵۰ سال، بیماران ۵۰ تا ۶۴ سال و بیماران ۶۵ سال و بالاتر، به‌ترتیب ۷۷ درصد، ۶۱ درصد و ۴۶ درصد گزارش

شده است. مطالعات نشان می‌دهند که زنان سالمند یک زیرگروه پرخطر محسوب می‌شوند، اغلب درمان کمتر از حد مطلوب دریافت می‌کنند و مرگ‌ومیر بیشتری دارند. حتی استفاده از براکی‌تراپی به‌تنهایی نیز در زنان سالمند مبتلا به سرطان دهانه رحم می‌تواند مزیت بقای قابل توجهی ایجاد کند.

۲-۱-۲، سیس‌پلاتین

سیس‌پلاتین یک عامل ضدنئوپلاستیک است که از اواخر دهه ۱۹۷۰ وارد کاربرد بالینی شد. این دارو، با وجود سمیت قابل توجه، یکی از پرکاربردترین عوامل شیمی‌درمانی در درمان بدخیمی‌های خونی و تومورهای جامد محسوب می‌شود. سیس‌پلاتین می‌تواند به‌صورت تک‌دارویی یا در ترکیب با سایر داروها برای درمان القایی و درمان نئوآدجوانت مورد استفاده قرار گیرد.

۲-۱-۲-۱، موارد مصرف در بزرگسالان

سیس‌پلاتین از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا یا FDA برای درمان سرطان پیشرفته تخمدان، سرطان بیضه و کارسینوم مثانه تأیید شده است (۴۹). با این حال، پزشکان در بسیاری از موارد، از سیس‌پلاتین به‌صورت خارج از اندیکاسیون رسمی یا off-label برای درمان بدخیمی‌های دیگر نیز استفاده می‌کنند؛ به‌ویژه زمانی که منافع درمانی آن بر خطر عوارض دارویی احتمالی غلبه داشته باشد.

برخی بدخیمی‌هایی که بیشتر در زنان دیده می‌شوند، مانند سرطان پستان، سرطان دهانه رحم، کارسینوم آندومتر و نئوپلازی تروفوبلاستیک بارداری، گاهی با سیس‌پلاتین در ترکیب با داروهای دیگر مانند مشتقات تاکسان، ۵-FU و دوکسوروبیسین درمان می‌شوند (۵۰). اگرچه تومورهای حساس به هورمون و تومورهای Her2neu مثبت ممکن است پاسخ مطلوبی به درمان‌های هدفمند نشان دهند، سیس‌پلاتین در درمان سرطان پستان سه‌گانه منفی نیز به‌عنوان درمان نئوآدجوانت تک‌دارویی کاربرد دارد (۵۱).

بدخیمی‌های دستگاه گوارش، از جمله سرطان مری، معده و سرطان‌های هپاتوبیلیاری نیز به‌صورت off-label با این دارو، گاه همراه با پرتودرمانی، درمان شده‌اند (۵۲). سرطان پیشرفته دهانه رحم نیز یکی دیگر

از موارد مصرف خارج از اندیکاسیون رسمی سیس پلاتین است. سرطان ریه، چه از نوع سلول کوچک و چه غیرسلول کوچک، می تواند به صورت off-label با رژیم ترکیبی اتوپوزاید و سیس پلاتین درمان شود (۵۳). سایر کاربردهای off-label سیس پلاتین شامل درمان سرطان های متاستاتیک، پیشرفته و مقاوم به درمان است. این موارد شامل لنفوم هوچکین، لنفوم غیرهوچکین، سرطان آلت تناسلی، تیموما، سرطان های سر و گردن، استئوسارکوم، مولتیپل میلوما و مزوتلیوما می شود (۵۴).

۲-۲-۱-۲، موارد مصرف در کودکان

سیس پلاتین هیچ اندیکاسیون تأییدشده ای برای درمان در کودکان ندارد. با این حال، در صورت استفاده off-label، معمولاً برای تومورهایی به کار می رود که از نظر تاریخی رفتار تهاجمی تری دارند (۵۵). این دارو گاهی در درمان تومورهای سلول زایا، هیپاتوبلاستوما، مدولوبلاستوما، نوروبلاستوما و استئوسارکوم مفید است، اما دستورالعمل های یکپارچه و جهانی درباره دوز و مدت درمان در این موارد در دسترس نیست (۵۶).

۲-۲-۳، مکانیسم اثر

سیس پلاتین از طریق سمیت سلولی غیر وابسته به چرخه سلولی عمل می کند. این اثر از راه اتصال کووالانسی پلاتین به بازهای پورینی DNA، به ویژه گوانین و آدنین، ایجاد می شود. این اتصال کووالانسی باعث ایجاد پیوندهای عرضی درون رشته ای و بین رشته ای در DNA شده و در نهایت به شکست رشته های DNA منجر می گردد. اگرچه مکانیسم های ترمیم DNA در سلول فعال می شوند، اما به دلیل باقی ماندن آسیب در DNA، RNA و پروتئین ها، سلول ها اغلب دچار مرگ سلولی آپوپتوتیک یا غیرآپوپتوتیک می شوند (۵۷).

شیمی درمانی با سیس پلاتین به ویژه در هدف قرار دادن سلول هایی که به سرعت تقسیم می شوند مؤثر است؛ همان گونه که در تومورهای بدخیم با رشد سریع مشاهده می شود (۵۸). از نظر تئوریک، سیس پلاتین ممکن است در تومورهایی که رشد آهسته تری دارند، اثربخشی کمتری داشته باشد. این دارو عمدتاً از طریق ادرار

دفع می‌شود و حدود ۱۰ درصد آن از طریق صفرا دفع می‌گردد. نیمه‌عمر اولیه سیس‌پلاتین حدود ۲۰ تا ۳۰ دقیقه است، در حالی‌که نیمه‌عمر نهایی آن حدود ۲۴ ساعت گزارش شده است. بخش متصل به آلبومین پلاتین، دفع آهسته‌تری دارد و حداقل طی پنج روز به تدریج حذف می‌شود (۵۹).

۲-۱-۳، استاتین‌ها

مهارکننده‌های هیدروکسی‌متیل‌گلوټاریل کوآنزیم A ردوکتاز یا HMG-CoA reductase inhibitors که با عنوان استاتین‌ها نیز شناخته می‌شوند، باعث کاهش کلسترول تام، لیپوپروتئین با چگالی پایین یا LDL و تری‌گلیسیریدها می‌شوند و در مقابل، غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا یا HDL را افزایش می‌دهند. استاتین‌های تأییدشده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا یا FDA شامل آتورواستاتین، روزوواستاتین، سیمواستاتین، پراواستاتین، فلوواستاتین، لوواستاتین و پیتاواستاتین هستند (۶۰). پزشکان سال‌هاست که از داروهای خانواده استاتین، همراه با اصلاح رژیم غذایی و فعالیت بدنی، برای درمان هیپرکلسترولمی، هیپرلیپوپروتئینمی و هیپرتری‌گلیسیریدمی استفاده می‌کنند. این داروها عمدتاً برای پیشگیری اولیه و ثانویه از بیماری عروق کرونر به کار می‌روند. موارد مصرف تأییدشده توسط FDA در میان داروهای مختلف این گروه تا حدی متفاوت است (۶۱).

۲-۱-۳-۱، مکانیسم اثر

استاتین‌ها مهارکننده‌های انتخابی و رقابتی آنزیم هیدروکسی‌متیل‌گلوټاریل کوآنزیم A ردوکتاز هستند؛ آنزیمی که مسئول تبدیل HMG-CoA به موالات در مسیر سنتز کلسترول است. با کاهش سنتز کلسترول در کبد، بیان گیرنده‌های LDL افزایش می‌یابد و برداشت کبدی LDL-کلسترول از گردش خون بیشتر می‌شود. درمان با استاتین همچنین میزان تولید کبدی لیپوپروتئین‌های حاوی apo B100 را کاهش می‌دهد و در نتیجه، غلظت کلسترول و تری‌گلیسیرید کاهش پیدا می‌کند. پاسخ دارویی ممکن است بر اساس عوامل

ژنتیکی نیز متفاوت باشد؛ از جمله ژن‌های ATP-binding cassette G2، لیپوپروتئین (a) و apo E . همچنین ژن RhoA ممکن است در پاسخ C-LDL به استاتین‌ها نقش مهمی داشته باشد (۶۲). مهارکننده‌های HMG-CoA ردوکتاز دارای اثرات پلیوتروپیک هستند. استاتین‌ها سنتز واسطه‌های ایزوپرنوئیدی را که برای فعال‌سازی پروتئین‌های داخل‌سلولی یا پیام‌رسان مانند Ras, Rho, Rab, Rac, Ral و Rap لازم هستند، مهار می‌کنند. در نتیجه، این داروها اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیری و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی دارند. علاوه بر این، استاتین‌ها موجب پایداری پلاک‌های آترواسکلروتیک شده و از تجمع پلاکتی جلوگیری می‌کنند. این اثرات پلیوتروپیک به‌عنوان اثرات گروهی استاتین‌ها شناخته می‌شوند. نتایج مطالعه COSMOS، یعنی مطالعه آترواسکلروز کرونری برای سنجش اثرات روزوواستاتین با استفاده از سونوگرافی داخل‌عروقی در افراد ژاپنی، نشان داد که بیماران درمان‌شده با روزوواستاتین کاهش قابل توجهی در حجم پلاک داشتند؛ اثری که مستقل از کاهش LDL-C گزارش شد (۶۳).

۱-۲-۳، فارماکوکینتیک

جذب

جذب استاتین‌های لیپوفیل مانند آتورواستاتین، سیمواستاتین، فلوواستاتین، پیتاواستاتین و لوواستاتین سریع‌تر از استاتین‌های هیدروفیل مانند روزوواستاتین و پراواستاتین است. آتورواستاتین پس از مصرف خوراکی به‌طور کامل جذب می‌شود، اما دچار متابولیسم عبور اول گسترده می‌گردد؛ بنابراین فراهمی زیستی آن حدود ۱۲ درصد است. فراهمی زیستی پیتاواستاتین بیشترین مقدار را دارد و بیش از ۶۰ درصد گزارش شده است؛ پس از آن روزوواستاتین با حدود ۲۰ درصد قرار دارد، در حالی که فراهمی زیستی سیمواستاتین کمتر از ۵ درصد است (۶۴). سیمواستاتین و لوواستاتین پیش‌دارو هستند و از طریق هیدرولیز به فرم فعال تبدیل می‌شوند (۶۵).

توزیع

اتصال به پروتئین‌های پلاسما بر توزیع دارو و اثربخشی فارماکولوژیک آن اثر می‌گذارد، زیرا فقط بخش آزاد یا غیرمتصل دارو می‌تواند اثرات هدفمند خود را اعمال کند. همه استاتین‌ها، به‌جز پراواستاتین، اتصال بالایی به پروتئین‌های پلاسما دارند؛ میزان اتصال پروتئینی پراواستاتین حدود ۵۰ درصد است. استاتین‌های لیپوفیل می‌توانند از طریق انتشار غیرفعال وارد سلول‌ها شوند و در بافت‌های مختلف به‌طور گسترده توزیع می‌گردند. در مقابل، استاتین‌های هیدروفیل مانند پراواستاتین و روزوواستاتین به سطح قطبی غشای سلولی متصل می‌شوند و برای مهار HMG-CoA ردوکتاز به ناقل‌های پروتئینی نیاز دارند (۶۶).

متابولیسم

آنزیم CYP3A4 نقش مهمی در متابولیسم آتوروواستاتین، لوواستاتین و سیمواستاتین دارد. فلوواستاتین توسط CYP2C9 متابولیزه می‌شود. روزوواستاتین به میزان کمتری توسط CYP2C9 و CYP2C19 متابولیزه می‌گردد OATPB1. یا پلی‌پروتئین انتقال‌دهنده آنیون آلی، در حذف آتوروواستاتین، روزوواستاتین، سیمواستاتین، پیتاواستاتین و پراواستاتین نقش دارد؛ در حالی که OATPB3 در حذف روزوواستاتین، فلوواستاتین و پراواستاتین دخیل است. آتوروواستاتین و لوواستاتین هر دو هم سوبسترا و هم مهارکننده P-gp گلیکوپروتئین نفوذپذیری هستند (۶۷).

دفع

استاتین‌ها به‌طور گسترده متابولیزه می‌شوند و مقدار دارویی که به‌صورت تغییرنیافته از راه کلیه دفع می‌شود، نسبتاً کم است. روزوواستاتین متابولیسم گسترده‌ای ندارد و عمدتاً به‌صورت تغییرنیافته از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود. فلوواستاتین، لوواستاتین، پراواستاتین و سیمواستاتین نیمه‌عمر نسبتاً کوتاهی دارند. برای بیشینه‌سازی اثربخشی، این داروها باید هنگام عصر مصرف شوند یا در مورد فلوواستاتین و لوواستاتین، از فرم‌های آهسته‌رهش استفاده شود. در مقابل، آتوروواستاتین و روزوواستاتین نیمه‌عمر

طولانی‌تری دارند و می‌توان آن‌ها را در هر زمان از روز تجویز کرد. مهارکننده‌های HMG-CoA ردوکتاز از طریق صفرا و مدفوع دفع می‌شوند (۶۸).

۴-۱-۲، ایرینوتکان

یک مهارکننده DNA توپوایزومراز I است که در سال ۱۹۹۶ برای استفاده در ایالات متحده تأیید شد (۶۹). این دارو از درخت چینی *Camptotheca acuminata* مشتق شده و به‌عنوان یک عامل شیمی‌درمانی علیه انواع مختلف تومورهای جامد، از جمله سرطان‌های کولورکتال، پانکراس، تخمدان و ریه به کار می‌رود (۷۰). ایرینوتکان که با نام CPT-11 نیز شناخته می‌شود، در درمان سرطان کولورکتال به‌صورت کمکی و همراه با سایر عوامل درمانی، به‌عنوان درمان خط اول یا خط دوم استفاده می‌شود (۷۱).

۱-۴-۱-۲، مکانیسم اثر

DNA توپوایزومراز I در باز شدن و کاهش تنش مارپیچ دو رشته‌ای DNA هنگام همانندسازی و رونویسی نقش دارد (۷۲). این آنزیم با ایجاد شکست‌های تکرشته‌ای در DNA، باعث کاهش پیچ‌خوردگی بیش از حد^{۱۰} در مولکول DNA می‌شود (۷۲).

ایرینوتکان یک پیش‌دارو است که با مهار DNA توپوایزومراز I عمل می‌کند و عمدتاً بر فازهای S و G2 چرخه سلولی اثر می‌گذارد (۷۰). این دارو از طریق هیدرولیز توسط آنزیم کربوکسی‌استراز به متابولیت فعال زیستی خود، یعنی SN-38، تبدیل می‌شود (۷۳). سپس فعالیت آنزیم‌های UDP-گلوکورونیل ترانسفراز موجب غیرفعال شدن SN-38 و تبدیل آن به فرم SN-38G می‌گردد (۷۴).

^{۱۰} supercoiling

۲-۲: بررسی متون

در مطالعه‌ای که Gauhar Sarbassova و همکاران در سال ۲۰۲۳ با هدف بررسی خاصیت ضدتکثیری پنج نوع استاتین شامل سیمواستاتین، روزوواستاتین، فلوواستاتین، آتورواستاتین و پراواستاتین بر روی انواعی از سرطان‌ها از جمله کارسینوم یوئینگ، کارسینوم هیپاتوسلولار، سرطان دهانه رحم و سرطان پستان انجام دادند، نتایج نشان داد که سیمواستاتین و آتورواستاتین به‌طور قابل توجهی حدود ۷۰ درصد از تکثیر سلولی را مهار کردند. در همان غلظت، روزوواستاتین و فلوواستاتین حدود ۵۰ درصد مهار تکثیر را فقط در سلول‌های سرطانی A-375 و A-673 به‌صورت وابسته به زمان و دوز نشان دادند. در مقابل، پراواستاتین کمترین اثر ضدتکثیری را بر سلول‌های سرطانی داشت. بر اساس نتایج این مطالعه، سیمواستاتین و آتورواستاتین ممکن است از طریق مسیرهای سیگنالینگ BCL-2/p53، Bax/Bak و PI3K/Akt/mTOR از تکثیر سلولی جلوگیری کنند (۱۷).

در مطالعه‌ای که Xiong Ying و همکاران در سال ۲۰۱۱ با هدف بررسی اثرات بالینی ایرینوتکان هیدروکلراید در ترکیب با سیس‌پلاتین به‌عنوان شیمی‌درمانی نئوآدجوانت در سرطان پیشرفته دهانه رحم انجام دادند، ۱۲۰ بیمار در قالب دو گروه ۶۰ نفری بررسی شدند. در این مطالعه، یک گروه درمان ترکیبی دریافت کرد و گروه دیگر بدون دریافت درمان نئوآدجوانت، مستقیماً تحت عمل جراحی قرار گرفت. نتایج نهایی نشان داد که درمان ترکیبی ایرینوتکان و سیس‌پلاتین در سرطان دهانه رحم، اثربخشی بالایی دارد و با سمیت قابل تحمل همراه است. همچنین این ترکیب توانست به‌طور چشمگیری تهاجم عمقی استرومای دهانه رحم و متاستاز غدد لنفاوی لگنی را کاهش دهد (۷۵).

در مطالعه‌ای که Ji-Youn Han و همکاران در سال ۲۰۱۰ با هدف بررسی اثربخشی سیمواستاتین در ترکیب با ایرینوتکان و سیس‌پلاتین در درمان بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) انجام دادند، ۶۱ بیمار در قالب یک کارآزمایی بالینی فاز ۲ بررسی شدند. بیماران، ایرینوتکان با دوز 65 mg/m^2 و

سیس‌پلاتین با دوز 30 mg/m^2 را در روزهای ۱ و ۸ هر چرخه سه‌هفته‌ای تا زمان مرگ یا پیشرفت بیماری دریافت کردند. همچنین سیمواستاتین خوراکی با دوز 40 mg/day در طول دوره شیمی‌درمانی و به مدت یک سال تجویز شد. نتایج نشان داد که افزودن سیمواستاتین به ترکیب ایرینوتکان و سیس‌پلاتین، بقای بیماران مبتلا به SCLC را بهبود بخشید؛ هرچند ممکن است در بیماران سیگاری مبتلا به این نوع سرطان اثرات مثبتی داشته باشد (۷۶).

در مطالعه‌ای که Minerva و همکاران در سال ۲۰۲۳ درباره سیس‌پلاتین و درمان‌های ترکیبی مبتنی بر آن انجام دادند، نتایج نشان داد که درمان ترکیبی با سیس‌پلاتین می‌تواند مقاومت دارویی نسبت به سیس‌پلاتین و اثرات سمی آن را کاهش دهد. کاربرد اصلی سیس‌پلاتین از طریق القای آسیب DNA و مهار تکثیر سلولی مطرح می‌شود. در این مطالعه، ترکیب سیس‌پلاتین با داروهایی مانند پاکلیتاکسل، دوکسوروبیسین، تگافور-اوراسیل و ایرینوتکان به عنوان راهکاری برای تقویت دارورسانی سیس‌پلاتین، افزایش اثربخشی درمان و کاهش سمیت در بیماران سرطانی پیشنهاد شده است (۷۷).

در مطالعه‌ای که Qiang Zhou، Zhihua Jiao و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام دادند، نتایج نشان داد که درمان با استاتین‌ها می‌تواند میزان مرگ‌ومیر را در طیف وسیعی از انواع سرطان کاهش دهد. در این مطالعه، نسبت خطر مربوط به بقای کلی، بقای اختصاصی سرطان و بقای بدون پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته که درمان با استاتین دریافت کرده بودند، بررسی شد. نتایج نشان داد که درمان با استاتین با کاهش ۲۶ درصدی خطر مرگ در بقای کلی، کاهش ۲۶ درصدی خطر در بقای اختصاصی سرطان و کاهش ۲۴ درصدی خطر پیشرفت بیماری همراه بود. بنابراین، درمان با استاتین می‌تواند مزایای قابل توجهی در بهبود بقای کلی و بقای اختصاصی سرطان داشته باشد. هرچند ممکن است اثربخشی آن کمتر از برخی داروهای ایمونوتراپی تأیید شده باشد، اما مقرون به صرفه بودن استاتین‌ها می‌تواند در کاهش پیامدهای نامطلوب سرطان اهمیت بالینی داشته باشد (۷۸).

در مطالعه‌ای که Youngjoo Lee و همکاران در سال ۲۰۲۳ درباره ترکیب ایرینوتکان و سیس‌پلاتین با یا بدون سیمواستاتین در بیماران سیگاری مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک با بیماری گسترده انجام دادند، ۱۲۵ بیمار طی بازه زمانی ۱۶ سپتامبر ۲۰۱۱ تا ۹ سپتامبر ۲۰۲۱ به صورت تصادفی در دو گروه سیمواستاتین و کنترل قرار گرفتند؛ به طوری که ۶۲ بیمار در گروه سیمواستاتین و ۶۳ بیمار در گروه کنترل بودند. میانگین مصرف سیگار در بیماران ۴۰ پاکت-سال گزارش شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان بقای یک‌ساله بین گروه سیمواستاتین و گروه کنترل وجود نداشت؛ به طوری که بقای یک‌ساله در گروه سیمواستاتین ۵۳,۲٪ و در گروه کنترل ۵۸,۷٪ بود ($p=0.535$). همچنین میانه بقای بدون پیشرفت بیماری به ترتیب ۶,۳ ماه در برابر ۶,۴ ماه ($p=0.686$) و میانه بقای کلی ۱۴,۴ ماه در برابر ۱۵,۲ ماه ($p=0.749$) گزارش شد. میزان بروز عوارض جانبی درجه ۳ و ۴ نیز در گروه سیمواستاتین ۶۲,۹٪ و در گروه کنترل ۶۱,۹٪ بود. بنابراین، نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سیمواستاتین به درمان ترکیبی ایرینوتکان و سیس‌پلاتین، سود قابل توجهی در بقای بیماران سیگاری مبتلا به سرطان ریه سلول کوچک ایجاد نمی‌کند (۷۹).

فصل سوم: مواد و

روش کار

۱-۳- نوع مطالعه

مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (تجربی) صورت گرفته است.

۲-۳- محل مطالعه

این مطالعه در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام شد.

۳-۳- جامعه آماری و روش نمونه گیری

جامعه آماری این مطالعه شامل رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم CaSki و Hela و رده سلولی نرمال فیبروبلاست انسانی HFFF2 بود که همگی از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و به صورت سلول‌های کشت‌شده در فلاسک‌های کشت سلولی T-25 سانتی‌متر مربع نگهداری شدند. گروه‌های دارویی مورد بررسی در این مطالعه شامل آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت مونوتراپی و ترکیبات دارویی آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آتورواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین به صورت درمان ترکیبی بودند.

۳-۴- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری

میزان آپوپتوز سلولی با استفاده از فلوسیتومتری (Sysmex-Cyflow) تعیین شد و نتایج با نرم‌افزار FlowJo 10.0 تجزیه و تحلیل شدند. برای تعیین کیفی و کمی توانایی مهاجرت سلول‌های سرطانی، با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus) تصویربرداری شد.

کلیه آنالیزهای آماری تست‌های بررسی میزان القای آپپتوز، مهاجرت سلولی و میزان سطح بیان ژن در بین گروه‌های مختلف و مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹,۴,۱ انجام شد. به‌منظور بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌های مختلف، برای داده‌های پارامتریک از آزمون t مستقل

(Unpaired Student's t-test) و یا آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها به صورت مستقل و در سه تکرار جداگانه انجام گرفت. سطوح معنی‌داری آماری به صورت زیر در نظر گرفته شد:

$$p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 \text{ و } ****p < 0.0001$$

به منظور ارزیابی نوع تعامل دارویی در تیمارهای ترکیبی، شاخص ترکیب (^{15}CI) با استفاده از نرم افزار CompuSyn (ComboSyn Inc., USA) محاسبه گردید. بر اساس معیار CI، مقادیر کمتر از ۱ نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی (Synergistic effect)، مقدار برابر با ۱ بیانگر اثر افزایشی (Additive effect) و مقادیر بیشتر از ۱ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی (Antagonistic effect) بین داروها در نظر گرفته شد.

۳-۵- متغیرها

جدول ۱-۳: جدول متغیرها

¹⁵ Combination Index

نام متغیر	نوع متغیر	گروه‌بندی کمی-کیفی	مقیاس اندازه گیری
ایرینوتکان	مستقل	کمی - پیوسته	ratio
سیس پلاتین	مستقل	کمی - پیوسته	ratio
سیمواستاتین	مستقل	کمی - پیوسته	ratio
آتورواستاتین	مستقل	کمی - پیوسته	ratio
BCL2	وابسته	کمی - پیوسته	ratio
Caspase 3	وابسته	کمی - پیوسته	ratio
P27	وابسته	کمی - پیوسته	ratio
میزان آپوپتوز	وابسته	کمی - گسسته	ratio

۳-۶- ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و به صورت *in vitro* انجام شد. در این پژوهش، از مواد کارسینوژن و توکسیک استفاده نشد و تمامی جنبه‌های ایمنی برای محققین طرح رعایت گردید. همچنین، تمام مراحل اجرایی آزمایشات تحت نظارت متخصصین مربوطه و با پیروی از اصول اخلاقی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل صورت پذیرفت.

شناسه اخلاق: IR.ARUMS.MEDICINE.REC.1403.097

۳-۷- متدولوژی مطالعه

این پژوهش از نوع مطالعه بنیادی (*in vitro*) تجربی است که بر اساس مشاهده و آزمون طراحی شده و با هدف " بررسی اثر هم افزایی سیس پلاتین و ایرینوتکان به همراه سیمواستاتین و آترواستاتین در جهت القای مرگ سلولی در سلول های سرطان دهانه رحم " انجام گردیده است. جامعه آماری این مطالعه شامل رده سلولی های سلولی CaSki و HeLa سرطان دهانه رحم و رده سلولی نرمال فیبروبلاست انسانی HFFF2 است که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌اند و به صورت سلول‌های کشت شده در فلاسک‌های کشت سلولی T-25 سانتی متر مربع قرار داده شده‌اند. گروه های دارویی در این مطالعه شامل آترواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت مونوتراپی و ترکیبات دارویی آترواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آترواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین به صورت درمان ترکیبی و نمونه‌های بدون تیمار به عنوان گروه کنترل است. برای بررسی اثر سیتوتوکسیسیته مونوتراپی و کامبینیشن تراپی ابتدا سلول‌های سرطانی CaSki و HeLa و سلول های نرمال فیبروبلاست انسانی HFFF2 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS تحت شرایط ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ °C در حضور غلظت‌های مختلفی از ترکیبات دارویی و استاتین ها کشت داده شدند. همچنین، از سلول‌های CaSki و HeLa و HFFF2 که تیمار نشده بودند، به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

به منظور بررسی میزان مهار رشد و تکثیر سلول‌های سلول‌های CaSki، HeLa و HFFF2 پس از انکوباسیون با آترواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت مونوتراپی و ترکیبات دارویی آترواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آترواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین در محیط کشت و گذشت زمان مورد نظر، محیط کشت قبلی با محیط کشت حاوی MTT تعویض شد و پس از انکوباسیون، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Plate Reader اندازه‌گیری گردید.

برای بررسی کمی آپوپتوز، سلول‌های سرطانی پس از تیمار با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت مونوترایی و ترکیبات دارویی آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آتورواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری آنالیز شدند. در این روش، سلول‌های CaSki و HeLa از کف فلاسک با افزودن آنزیم تریپسین جدا شدند و سلول‌ها به پلیت‌های ۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت کامل RPMI-1640 اضافه و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت سلولی به طور کامل از سطح پلیت‌ها برداشته شد و سلول‌ها با غلظت تعیین شده (IC50) برای مونوترایی و ترکیبات بهینه برای کامبینیشن تراپی از تست MTT تیمار شده؛ و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، گروه‌های مورد مطالعه برای ارزیابی فلورسانت با کیت Annexin V-FITC رنگ‌آمیزی شده و در نهایت با دستگاه BD FACS-Calibur flow cytometer آنالیز شدند.

جهت بررسی در سطح آزمایشگاهی، RNA کامل (توتال) از سلول‌های کشت‌شده توسط تریزول استخراج و پس از تهیه cDNA به وسیله کیت سنتز، با استفاده از روش Quantitative real-time PCR میزان بیان ژن های BCL2، CASP3 و P27 بررسی گردید.

آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA و Student t-test و توسط نرم‌افزار PRISM انجام گرفت. در این مطالعه، به‌طور مستقل از رده‌های سلولی حیوانی یا انسانی استفاده نشد و رده سلولی مورد استفاده از بانک سلولی دریافت گردید. هیچ خطری برای فرد مجری مطالعه در شرایط آزمایشگاهی وجود نداشت و محقق تمامی نکات ایمنی مربوط به آزمایشگاه را رعایت نمود.

۳-۸- طرح مطالعه

۳-۸-۱- کشت سلولی

۳-۸-۱-۱- محیط کشت RPMI-1640

در این پژوهش، از محیط کشت پودری شکل RPMI-1640 حاوی گلوتامین و فاقد بی‌کربنات سدیم استفاده شد. این محیط از شرکت Sigma تهیه گردید. برای آماده‌سازی یک لیتر از این محیط، از مواد زیر استفاده شد.

- پودر RPMI1640: ۱۰/۳۹ گرم
- بی‌کربنات سدیم: ۲ گرم
- استرپتومایسین/پنی‌سیلین: ۱۰ ml به غلظت ۱٪
- آب مقطر: یک لیتر

ابتدا پودر RPMI1640 و بی‌کربنات سدیم توزین شده و در آب مقطر حل شدند. پس از انحلال کامل، با استفاده از محلول‌های یک نرمال NaOH و HCl، pH محلول به ۷٫۴ تنظیم شد. سپس محلول به‌منظور استریلیزاسیون، از فیلترهای با قطر منفذ ۰٫۲۲ میکرون عبور داده شد. بعد از فیلتر شدن، ۵ سی‌سی آنتی‌بیوتیک به محلول افزوده شد. محیط تهیه شده در دمای ۲ تا ۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای کنترل آلودگی، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط در فالكون ریخته و به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفت؛ در صورت عدم آلودگی، مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۸-۲- رده‌های سلولی

مطالعه حاضر بر روی رده‌های سلولی CaSki و HeLa سرطان دهانه رحم و سلول‌های نرمال فیبروبلاست انسانی HFFF2 انجام شد که از انستیتو پاستور ایران به صورت ویال خریداری گردیدند. محیط کشت مورد استفاده برای کشت این رده RPMI-1640 به همراه ۱۰ درصد FBS بود.

۳-۱-۸-۳- شمارش سلولی

رایج ترین ابزار برای شمارش سلولی، لام نئوبار هموسایتومتر است. این لام دارای دو محفظه و هر محفظه شامل ۹ مربع است که با خطوط افقی و عمودی به شکل شبکه‌ای تقسیم‌بندی شده‌اند. شمارش بر اساس میانگین سلول‌ها در ۴ مربع که خود از ۱۶ مربع کوچکتر تشکیل شده‌اند، انجام می‌شود. هر مربع بزرگ کناری دارای مساحت ۱ میلی‌متر مربع و عمق ۰,۱ میلی‌متر است، که حجم نهایی آن برابر ۱۰^4 میلی‌لیتر می‌گردد. پس از افزودن سوسپانسیون سلولی با پیپت مناسب، تعداد سلول‌ها در مربع بزرگ معادل تعداد سلول‌ها در ۱۰^4 میلی‌لیتر محلول خواهد بود.

مواد لازم:

- 100 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی
- لام نئوبار / هموسایتومتر
- میکروسکوپ

روش اجرا:

۱. پس از پیپتینگ دقیق، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به یکی از محفظه‌های لام اضافه می‌شود. این پیپتینگ به شکستن توده‌های سلولی کمک کرده و دقت را افزایش می‌دهد.
۲. سلول‌های موجود در مربع‌های بزرگ کناری (شامل ۱۶ مربع کوچک) شمارش می‌شوند؛ برای افزایش دقت، ۴ مربع بزرگ شمارش شده و میانگین گرفته می‌شود. این عدد در ضریب ۱۰^4 ضرب شده تا تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر تعیین شود.

۳-۱-۸-۴- دفریز کردن سلول‌ها

- ابتدا ۵ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 در فالتون ریخته شد.
- ویال منجمد سلولی از فریزر یا نیتروژن مایع خارج و سریع در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.
- سلول‌ها به فالتون حاوی محیط منتقل شده و برای حذف DMSO به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm

سانتریفوژ شدند.

- پس از سانتریفوژ، مایع رویی حذف و رسوب سلولی به فلاسک حاوی ۳ تا ۵ میلی لیتر محیط کامل منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵% CO₂ قرار گرفت.
- زمان ذوب سلول‌ها نباید بیش از ۳ تا ۵ دقیقه به طول انجامد.

۳-۸-۱-۵-فریز کردن و ذخیره رده های سلولی

- ابتدا مایع فلاسک خارج و سلول‌های در فاز رشد لگاریتمی با محلول ۰/۲۵ % Trypsin/EDTA جدا شدند.
- سلول‌های جدا شده به فالكون حاوی ۵ میلی لیتر محیط RPMI-1640 منتقل شده و در ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه شدند.
- سپس رسوب سلولی به کرایوتیوپ حاوی محیط خنک با ۱۰% DMSO اضافه گردید.
- کرایوتیوپ ابتدا در دمای ۲۰- درجه فریز شد، سپس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۷۰- درجه و نهایتاً به تانک نیتروژن مایع منتقل شد.
- DMSO به عنوان ماده محافظ استفاده می‌شود و به دلیل سمیت در دمای آزمایشگاه، پس از افزودن آن، فریز کردن باید به سرعت انجام شود.

۳-۸-۲- بررسی خاصیت سایتوتوکسیک با روش MTT

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) یک ترکیب زرد رنگ محلول در آب است که توسط آنزیم‌های میتوکندریایی سلول‌های زنده احیا شده و به فرم غیرمحلول فورمازان بنفش تبدیل می‌شود. این تست رنگ‌سنجی جهت بررسی فعالیت آنزیمی سلول‌ها، تکثیر و اثرات سایتوتوکسیک داروها استفاده می‌شود.

مواد مورد نیاز:

- رده های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2
- محیط کشت کامل RPMI-1640+10% FBS
- پودر MTT
- محلول های PBS/EDTA, 0/25% Trypsin/EDTA
- پلیت ۹۶ خانه ای
- سمپلر و تیپ
- دستگاه الیزا ریدر

روش کار

۱. رده های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2 در فلاسک های کوچک T25 کشت داده شدند.
۲. پس از رسیدن به تراکم مطلوب، مایع رویی خارج شده، سلول ها با PBS شستشو داده شده و ۱ میلی لیتر محلول Trypsin/EDTA 0/25% به هر فلاسک اضافه و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند.
۳. سپس برای خنثی سازی Trypsin، ۲ میلی لیتر محیط کامل افزوده شد. سلول ها سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد.
۴. رسوب سلولی باز شده و تعداد سلول ها با لام نئوبار شمارش گردید.
۵. از سوسپانسیون سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر حاوی $10^3 \times 15$ سلول در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه ای افزوده شد.
۶. سپس سلول ها به صورت سه تایی با غلظت های مختلف تیمار شدند. گروه های کنترل شامل ۰ میکروگرم/میلی لیتر (DMSO) و تیمارهای دارویی شامل آتورواستاتین ($0.512 - 512 \mu\text{g/mL}$)، سیمواستاتین ($0.512 - 512 \mu\text{g/mL}$)، سیس پلاتین ($0.256 - 256 \mu\text{g/mL}$) و ایرینوتکان ($0.256 - 256 \mu\text{g/mL}$) بودند. هشت دوز مختلف برای هر گروه و مطابق مطالعات پیشین انتخاب شدند و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون انجام شد.

۷. پس از پایان زمان انکوباسیون، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کامل و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (2mg/ml) اضافه شده و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار گرفتند.
۸. سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسون به هر چاهک اضافه شد.
۹. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شده و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر خوانش گردید.

۳-۸-۳- بررسی اثر سینرژیسمی آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان،

آتورواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین با روش MTT

جهت بررسی اثر سینرژیسمی ترکیبات دارویی آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آتورواستاتین + سیمواستاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین در سلول‌های CaSki و HeLa براساس مقدار IC_{10,20,30,40} هر دارو به صورت مکمل (IC₁₀ آتورواستاتین/ سیمواستاتین + IC₄₀ داروی ایرینوتکان/ سیس پلاتین)، (IC₂₀ آتورواستاتین/ سیمواستاتین + IC₃₀ داروی ایرینوتکان/ سیس پلاتین)، (IC₃₀ آتورواستاتین/ سیمواستاتین + IC₂₀ داروی ایرینوتکان/ سیس پلاتین)، (IC₄₀ آتورواستاتین/ سیمواستاتین + IC₁₀ داروی ایرینوتکان/ سیس پلاتین) که براساس نتایج MTT مستقل آتورواستاتین و سیمواستاتین و داروی ایرینوتکان و سیس پلاتین به دست آمده بود به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس بعد از افزودن محلول MTT و پس از انکوباسیون، و در نهایت بعد از افزودن DMSO و انکوبه در تاریکی، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Plate Reader اندازه‌گیری گردید.

بعد از خوانش نتیجه MTT ترکیب‌های دارویی، نتایج با استفاده از نرم افزار CompuSyn آنالیز گردید و برای هر کدام از ترکیب‌ها یک شاخص ترکیبی¹⁶ (CI) مشخص گردید و ترکیبی که کمترین CI را داشت به عنوان ترکیب دارویی بهینه انتخاب شد. تفسیر شاخص ترکیبی به شرح زیر است: اگر $CI < 1$ باشد:

¹⁶ Combination Index

سینرژیسیم، $CI = 1$: افزایشی و $CI > 1$: آنتاگونیسم.

۳-۸-۴- بررسی میزان آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری

برای بررسی میزان القای آپوپتوز پس از تیمار با گروه های دارویی، از روش فلوسایتومتری و کیت-Annexin V-FITC/PI مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

۱. تعداد $10^5 \times 3$ در هرخانه از پلیت های ۶ خانه از سلول های CaSki و HeLa پخش و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

۲. سلول های CaSki و HeLa پس از تیمار با غلظت ها IC_{50} از آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت مونوترایی و ترکیبات دارویی سینرژیسیم آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین + ایرینوتکان، آتورواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی گراد و ۵% CO_2) انکوبه شدند.

۳. سپس سلول ها با استفاده از تریپسین جدا شده و محتویات هر کدام از خانه های پلیت ها به فالتون اختصاصی انتقال داده شد.

۴. سلول ها پس از دو بار سانترفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور 1500 rpm و به مدت ۵ دقیقه و شستشو با بافر PBS، در محلول Binding Buffer معلق گردیدند.

۵. پس از افزودن ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC و ۵ میکرولیتر PI به هر نمونه، سلول ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند. نمونه ها بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتر (BD FACS Calibur) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سلول های آپپتوتیک اولیه (Annexin V+/PI-)، سلول های آپپتوتیک دیررس (Annexin V+/PI+)، سلول های نکروتیک (Annexin V-/PI+) و سلول های زنده (Annexin V-/PI-) بر اساس نتایج دات پلات طبقه بندی و درصد آن ها تعیین گردید.

۳-۸-۵- بررسی بیان ژن های هدف با استفاده از qRT-PCR

RNA کامل (توتال) سلول های کشت داده شده با استفاده از معرف ترايزول استخراج گردید. پس از استخراج، سنتز cDNA با استفاده از کیت اختصاصی انجام شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن، از روش Real-Time PCR کمی (Quantitative Real-Time PCR) استفاده شد و بیان ژن های BCL2، CASP3 و P27 مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳-۸-۵-۱- استخراج RNA

برای استخراج RNA سلول ها از محلول TRIZol Reagent استفاده شد. روش انجام کار به صورت ذیل بود:

وسایل و مواد مورد نیاز:

- TRIZol Reagent
- کلروفرم
- اتانول ۷۵٪ سرد
- ایزوپروپانول سرد
- DEPC Water

روش کار:

۱. تعداد 1×10^6 در هرخانه از پلیت های ۶ خانه از سلول های CaSki و HeLa پخش و به مدت ۲۴

ساعت کشت داده شدند.

۲. سلول های CaSki و HeLa پس از تیمار با غلظت ها IC50 از آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین

و ایرینوتکان به صورت مونوتراپی و ترکیبات دارویی سینرژسم آتورواستاتین + ایرینوتکان، سیمواستاتین

+ ایرینوتکان، آتورواستاتین + سیس پلاتین و سیمواستاتین + سیس پلاتین به مدت ۱۸ ساعت در

انکوباتور (۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO₂) انکوبه شدند.

۳. پس از برداشت و حذف محیط کشت قبلی، بر روی سلول های داخل هر خانه از پلیت های ۶ خانه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول TRIzol Reagent افزوده و به آرامی پیپتاژ شد. سپس میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا کمپلکس های نوکلئوپروتئینی به طور کامل تفکیک یابند.
۴. در مرحله بعد، ۸۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه افزوده شده و تیوب ها به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان داده شدند؛ در این مرحله به دلیل حساسیت RNA، از ورتکس کردن اجتناب شد.
۵. نمونه ها به مدت ۳۰-۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور rpm 12000 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند.
۶. پس از سانتریفوژ، محتویات میکروتیوب به سه فاز مجزا تقسیم شد: فاز تحتانی زرد رنگ، فاز میانی شیری رنگ و فاز فوقانی شفاف. تنها فاز شفاف فوقانی با استفاده از سرسمپلر RNase & DNase-free برداشته و به میکروتیوبی استریل و عاری از نوکلئاز منتقل گردید. سپس به آن به میزان برابر مایع فوقانی برداشته شده ایزوپروپانول سرد افزوده شد. محلول به آرامی مخلوط گردید و به مدت ۱ الی ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه شد.
۷. بعد از انکوباسیون، میکروتیوب ها با دور rpm 12000 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی خارج شده و رسوب سفید به دست آمده در ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ حل شد. پس از ورتکس کوتاه، نمونه ها با دور rpm 12000 به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد درجه دوبار شستشو داده شدند.
۸. پس از تخلیه محلول رویی، تیوب ها در شرایط آزمایشگاهی و با درب باز نگهداری شدند تا الکل کاملاً تبخیر گردد. سپس رسوب در ۱۵ میکرولیتر DEPC Water حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد (در دستگاه Dry Bath) قرار گرفت تا RNA شفاف استخراج شود. در پایان، خلوص و غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ ارزیابی شد و نمونه ها تا زمان انجام آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

***در تمامی مراحل آزمایش لوله ها بایستی در داخل یخ قرار گیرند.

۳-۸-۵-۲- بررسی کمی RNA های استخراج شده

اندازه‌گیری مقدار و خلوص RNA برای تعیین مقدار هر نمونه برای سنتز cDNA یا Real Time PCR و همچنین بررسی تغییرات بیان ژن‌ها بسیار مهم است. اسپکتروفتومترهای نانودراپ با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج (A260) 260 nm، ابزار بسیار مناسبی در ارزیابی کمیت و کیفیت RNA هستند. در واقع بازهای آلی ساختمان نوکلئوتیدها دارای قابلیت جذب نور فرابنفش در طول موج 260 nm هستند. برای اندازه‌گیری مقدار RNA ابتدا با استفاده از آب فاقد نوکلئاز به عنوان بلانک دستگاه صفر می‌شود. سپس جذب نوری ۱ تا ۱٫۵ ناندا از محلول حاوی RNA در طول موج 260 nm توسط دستگاه خوانده می‌شود. به منظور بررسی خلوص RNA استخراج شده، این دستگاه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ را نیز نشان می‌دهد. به این ترتیب در ارتباط با نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰، نسبت‌های بین ۱٫۸ الی ۲٫۱ میزان قابل قبولی را از خلوص RNA نشان می‌دهد همچنین در خصوص نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰، این نسبت نشان‌دهنده آلودگی با محلول‌های شستشو، فنل یا پروتئین است و عدد بالای ۱٫۵ قابل قبول می‌باشد.

۳-۸-۵-۳- سنتز cDNA

به‌منظور ارزیابی میزان بیان ژن‌ها، پس از استخراج RNA نوبت به سنتز cDNA رسید. در این مرحله با استفاده از آنزیم Reverse Transcriptase سنتز cDNA انجام شد. آنزیم Reverse Transcriptase نوعی پلیمرز وابسته به RNA است که همانند تمام پلیمرزهای دیگر برای ساخت DNA علاوه بر dNTP ها به یک پرایمر کوتاه نیاز دارد. در سنتز cDNA از سه نوع پرایمر می‌توان استفاده کرد: oligo dT، Random Hexamer و پرایمر اختصاصی. از پرایمر oligo dT جهت سنتز cDNA از روی mRNA استفاده می‌شود چرا که دم پلی A در انتهای ۳ پرایم mRNA با این پرایمر مکمل می‌شود. از پرایمر Random hexamer جهت سنتز cDNA از روی mRNA و دیگر RNA های استخراج شده استفاده می‌شود. این پرایمر به صورت

توالی‌های ۶ نوکلئوتیدی تصادفی طراحی شده که به صورت تصادفی به نقاط مختلف RNA متصل می‌شود. پرایمر اختصاصی طراحی شده توسط کاربر که برای جداسازی cDNA ژن مورد نظر به کار می‌رود. واکنش سنتز cDNA توسط کیت یکتا تجهیز انجام شد. محتویات کیت سنتز cDNA شامل:

جدول ۳-۲: محتویات کیت سنتز cDNA

M-MLV (10000 U) 200u/ μ l
5X first-strand Buffer
Oligo(dT) 18 primer
Random hexamer primer
RNasein (40u/ μ l)
dNTP 10mM

در مرحله اول یکسان سازی غلظت RNA برای همه نمونه‌ها (سنتز cDNA با مقدار یکسان RNA) انجام شد و پس از ذوب نمونه RNA و پرایمرها روی یخ، مخلوط یک و دو واکنش طبق جداول زیر آماده گردید:

جدول ۳-۳: محتویات مخلوط واکنش ۱- سنتز cDNA

Materials		Quantity
Template RNA	Total RNA	0.1ng - 1 μ g
Primer	Random Hexamer, Oligo dT	2 μ l
DEPC- Water		Up to 13.5 μ l
Total Volume		13.5 μ l

جدول ۳-۴: محتویات مخلوط واکنش ۲- سنتز cDNA

Materials	Quantity
5X first-strand buffer	4 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
RNasin (400U μ l)	0.5 μ l
M-MLV	1 μ l

۱. در یک میکروتیوب مطابق جدول بالا مخلوط واکنش اول شامل RNA براساس غلظت RNA، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها افزوده و حجم تیوب را با آب RNase-Free به ۱۳,۵ میکرولیتر رسانده ایم.

۲. درب میکروتیوب ها را بسته و اسپین میکنیم و در کولین باکس گذاشتیم.

۳. میکروتیوب ها را در ترموسایکر در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه جهت اجرای مرحله اول سنتز cDNA قرار دادیم.

۴. در یک میکروتیوب جداگانه مطابق جدول بالا مخلوط واکنش دوم را درست کردیم.

۵. بعد از مرحله اول واکنش از مخلوط واکنش ۲ مقدار ۶,۵ میکرولیتر به میکروتیوب ها اضافه کردیم.

۶. درب میکروتیوب ها را بسته و اسپین میکنیم و در کولین باکس قرار دادیم.

۷. میکروتیوب ها را در ترموسایکر جهت اجرای مرحله دوم سنتز cDNA قرار دادیم.

مطابق پروتکل کیت مربوطه ابتدا جهت اتصال پرایمر oligo(dT) به RNA دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس جهت اتصال پرایمر random hexamer به RNA دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه برنامه ترموسایکر را تنظیم کردیم.

توجه: محصول cDNA حداکثر تا ۳ ماه قابل نگهداری در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد میباشد. لذا برای نگهداری طولانی مدت در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در این مطالعه، به منظور تعیین میزان بیان نسبی ژن ها، از دستگاه Real-Time PCR با نام تجاری Light[®] Cyclo ساخت شرکت Roche آلمان استفاده شد. این دستگاه امکان اندازه گیری دقیق و کمی تعداد کپی یک توالی خاص از RNA یا DNA را در طول واکنش PCR در زمان واقعی فراهم می کند و در مطالعات فیزیولوژیک و پاتولوژیک برای بررسی تغییرات بیان ژن ها کاربرد فراوانی دارد.

۴-۵-۳-دستگاه مخصوص real-time PCR و سیستم کامپیوتری متصل به دستگاه

دستگاه مجهز به شناساگری است که تمام این مراحل را از طریق سنجش نور فلورسنت ارزیابی می‌کند و به آسانی داده‌ها را به صورت نمودار نمایش می‌دهد. تکثیر محصولات PCR در شرایط کاملاً بهینه با روش Real Time موجب شده است که نسبت به سایر روش‌های ارزیابی mRNA، مزایایی مانند اختصاصیت و حساسیت بالاتر نسبت به تغییرات جزئی در بیان RNA داشته باشد. همچنین، در این روش به دلیل وجود مرحله *melting curve analysis*، معمولاً نیازی به انجام الکتروفورز بر روی محصول نهایی PCR نیست.

مراحل انجام کار:

کیت مورد نظر شامل مواد لازم برای انجام real-time PCR، از جمله پرایمرهای Forward و Reverse و SYBR Green Master Mix است.

جدول ۳-۵: لیست توالی پرایمرهای Forward و Reverse

Genes	/ Forward Reverse	Sequences
GAPDH	F	5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'
	R	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'
BCL2	F	5'-GAGCGTCAACCGGGAGATGTC -3'
	R	5'-TGCCGGTTCAGGTACTCAGTC -3'
CASP3	F	5'-ATGGTTTGAGCCTGAGCAGA-3'
	R	5'-GGCAGCATCATCCACACATAC-3'
P27	F	5'-TGGAGAAGCACTGCAGAGAC-3'
	R	5'-GCGTGTCCTCAGAGTTAGCC-3'

برای نرمال سازی بیان ژن هدف در هر نمونه، به کالیبراتور (Housekeeping) نیاز است که مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA و انجام real-time PCR را فراهم می‌کند. تمام مراحل آماده سازی مستر میکس و قرار دادن آن در دستگاه تا حد امکان دور از تابش مستقیم نور انجام می‌شود. مراحل انجام واکنش به شرح زیر است:

جدول ۳-۶: مقادیر و مواد لازم برای انجام real time PCR

Material	Volume/ mRNA	Volume/ HK
cDNA	2 μ l	2 μ l
2X QPCR Master Mix SYBR Green	10 μ l	10 μ l
mRNA specific forward primer (10 μ M)	0.8 μ l	
HK specific forward primer (10 μ M)		0.8 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ l
dH ₂ O	Up to 20 μ l	Up to 20 μ l
Total Volume	20 μ l	20 μ l

توجه: جهت نرمالیزه کردن بیان mRNA مورد نظر، آزمایش Real-time همزمان برای ژن House keeping هم انجام می شود.

جدول ۳-۷: شرایط دمایی واکنش Real-time PCR

Cycles	Duration of cycles	Temperature
1	15 min	95°C
35-40	15-30 seconds 60 seconds	95°C 55-60°C
1	Melting Analysis	55-95°C

واکنش تکثیر طی ۴۰ چرخه مطابق الگوی دمایی زیر انجام شد:

- ابتدا مرحله اول در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس مرحله بعد در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت.
- رنگ SYBR Green با اتصال به DNA دو رشته‌ای، سیگنال فلوئورسانس ایجاد می‌کند. در چرخه‌ای که واکنش وارد فاز لگاریتمی می‌شود و به آن CT (Threshold Cycle) گفته می‌شود، میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود.
- پس از پایان واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR نموداری ترسیم و بر اساس آن مقدار CT تعیین شد. برای ژن ها، GAPDH به عنوان *internal control* در نظر گرفته شد.
- برای نرمال سازی نتایج حاصل از Real-Time PCR از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد؛ به این صورت که اختلاف CT بین ژن ها و GAPDH به عنوان داده نهایی ثبت و مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

- $\Delta Ct = Ct - \text{خانه‌دار ژن هدف}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{گروه کنترل}$
- $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

فصل چہارم: نتائج

۴-۱- نتایج ارزیابی سیتوتوکسیسیتی داروهای مورد مطالعه بر رده‌های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2

۴-۱-۱- مهار رشد سلول‌های HeLa و CaSki و HFFF2 پس از تیمار با آتورواستاتین، سیمواستاتین،

سیس پلاتین و ایرینوتکان

به‌منظور بررسی میزان مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HeLa و CaSki و سلول‌های نرمال HFFF2 پس از تیمار با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان بر اساس غلظت‌های مشخص و انکوباسیون، و گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط کشت قبلی با محیط کشت حاوی MTT تعویض شد و پس از انکوباسیون، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Plate Reader اندازه‌گیری گردید. برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک آزمایش MTT انجام شد و IC50 به‌عنوان شاخصی از حساسیت سلولی محاسبه گردید.

نتایج تست MTT نشان داد که تیمار سلول‌ها به صورت جداگانه با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان، زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی HeLa و CaSki و همچنین سلول‌های فیبروبلاست انسانی طبیعی HFFF2 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱: میزان IC50 آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان در رده‌های سلولی HeLa و CaSki و

HFFF2 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

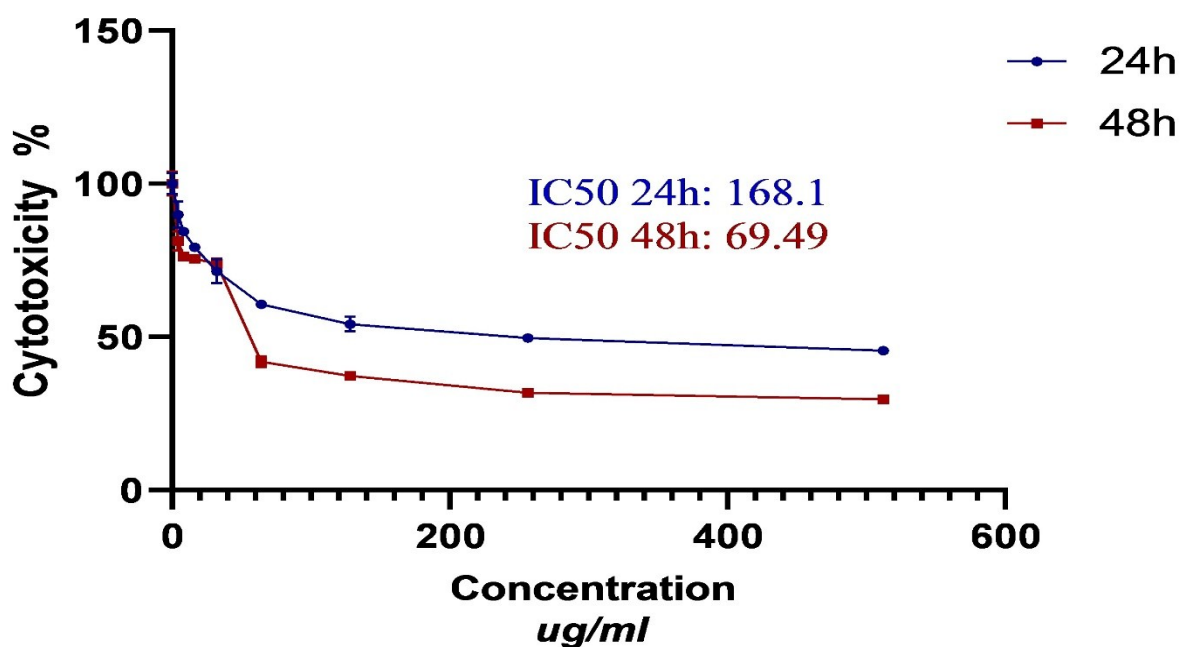
Group / Cell Line	24 H			48 H		
	HeLa	CaSki	HFFF2	HeLa	CaSki	HFFF2
Atorvastatin (µg/mL)	91.58	168.1	178.2	7.56	69.49	20.14
Simvastatin (µg/mL)	73.82	180.2	209.3	3.17	71.47	18.01
Cisplatin (µg/mL)	11.01	9.17	9.58	4.46	3.56	3.04
Irinotecan (µg/mL)	148.7	50.92	35.82	68.51	10.81	8.5

استفاده از آزمون MTT

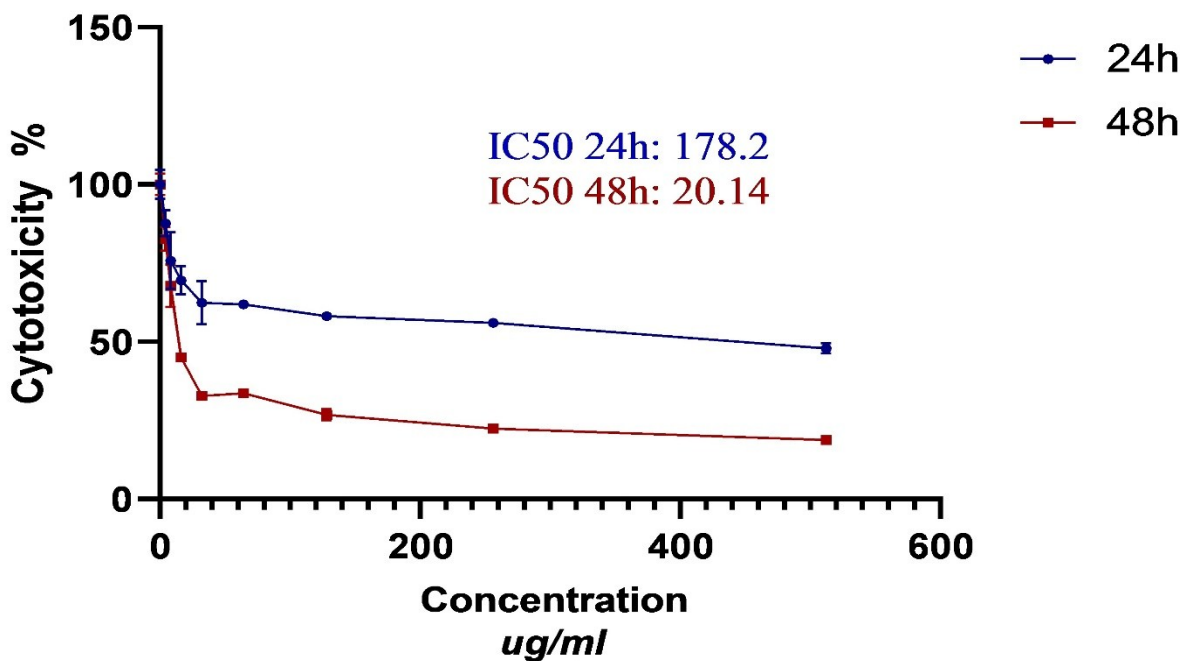
IC50 24h: 91.58
IC50 48h: 7.56

Concentration (ug/ml)	Cytotoxicity % (24h)	Cytotoxicity % (48h)
0	100	100
10	80	45
20	75	40
40	65	40
80	48	20
120	48	15
250	42	12
500	32	12

نمودار ۱-۴: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HeLa تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۲-۴: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CaSki تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

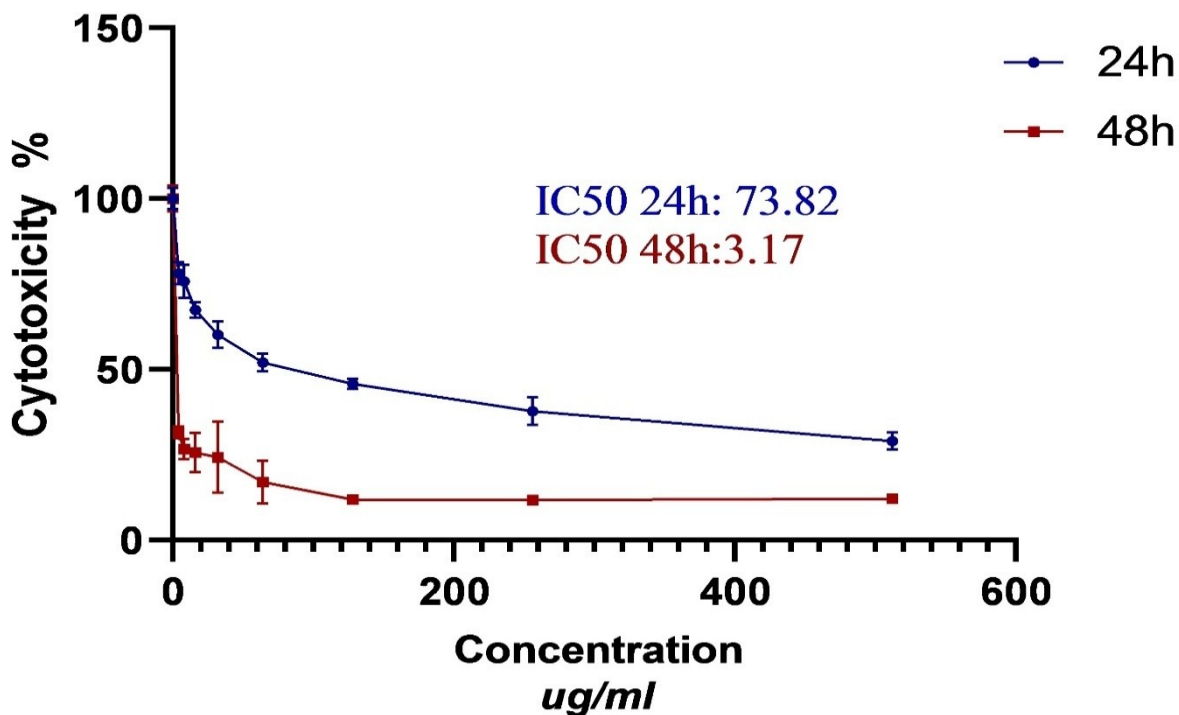


نمودار ۳-۴: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با آتورواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

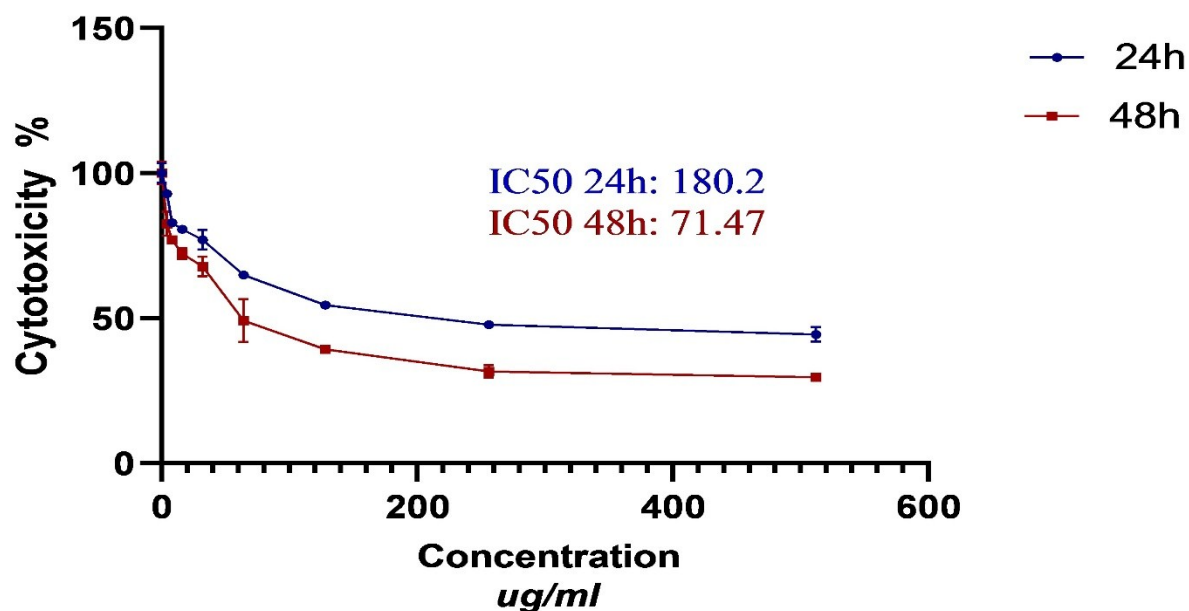
۴-۱-۱-۲- نتایج ارزیابی اثر سیمواستاتین بر زیست‌پذیری سلول‌های HeLa، CaSki و HFFF2 با

استفاده از آزمون MTT

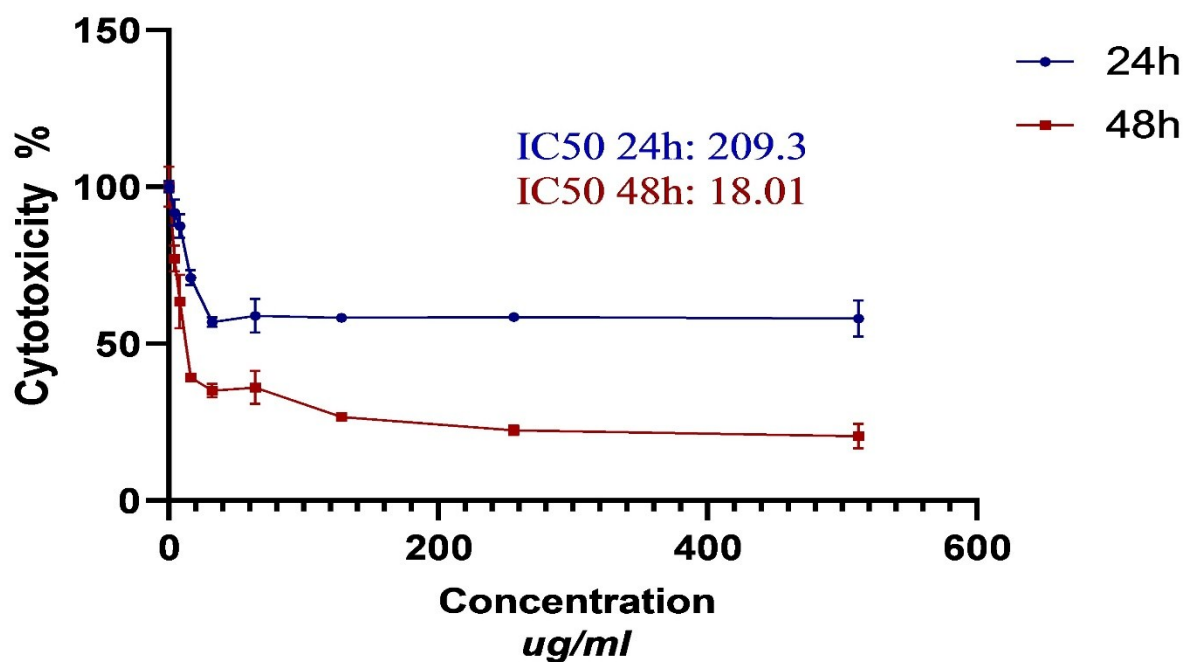
نمودارهای ۴-۴، ۴-۵ و ۴-۶ نتایج آزمون MTT را در سلول‌های HeLa، CaSki و HFFF2 نشان می‌دهند که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین (۰-۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در این نمودارها میزان زنده‌مانی سلولی (%) در برابر غلظت‌های مختلف دارو ($\mu\text{g/ml}$) رسم شده است. برای سیمواستاتین، مقادیر IC_{50} برای ۲۴ ساعت در رده‌های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2 به ترتیب ۷۳٫۸۲، ۱۸۰٫۲ و ۲۰۹٫۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین برای ۴۸ ساعت به ترتیب ۳٫۱۷، ۷۱٫۴۷ و ۱۸٫۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.



نمودار ۴-۴: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HeLa تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۴-۵: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CaSki تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

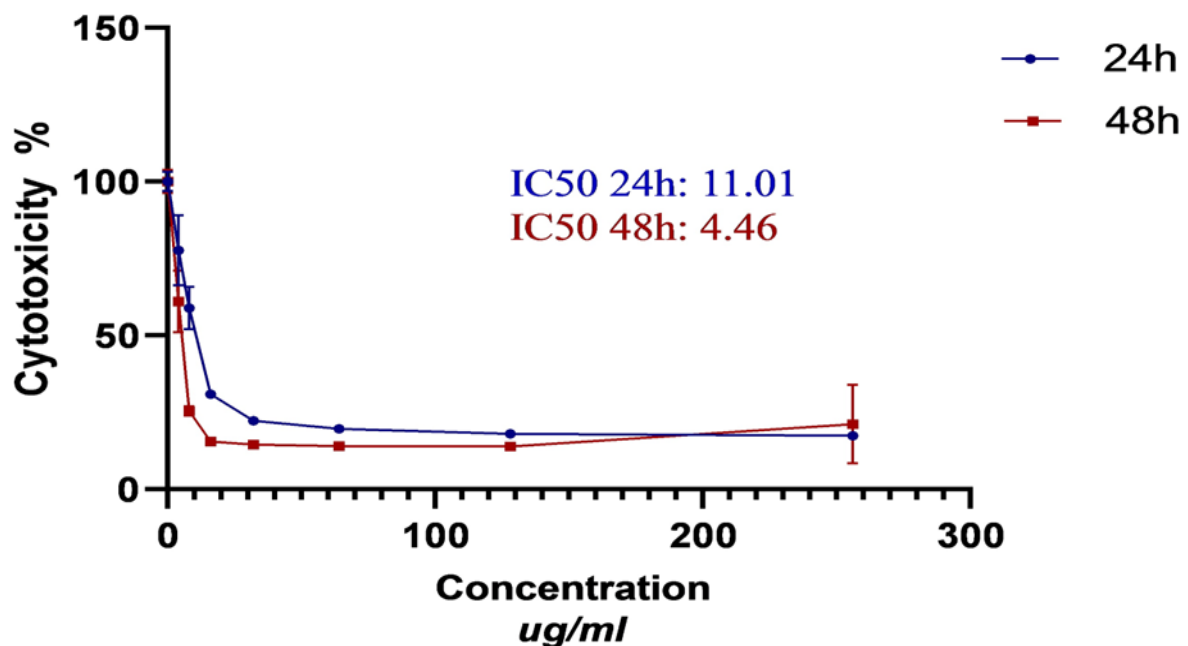


نمودار ۴-۶: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با سیمواستاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

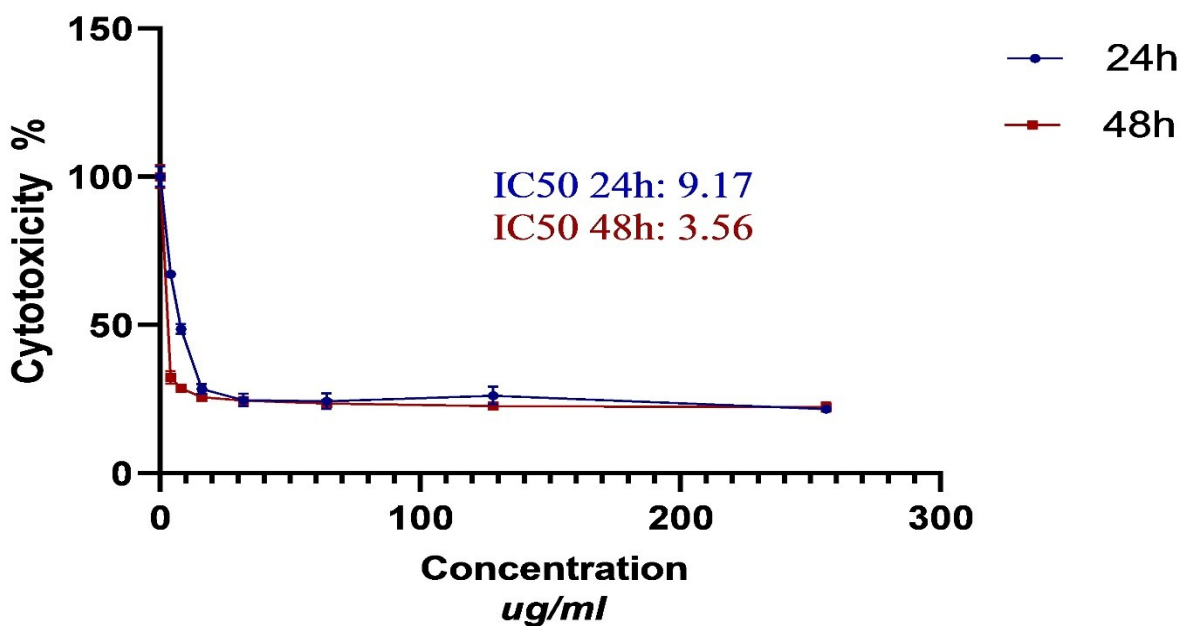
۳-۱-۱-۴- نتایج ارزیابی اثر سیس پلاتین بر زیست‌پذیری سلول‌های CaSki, HeLa و HFFF2 با

استفاده از آزمون MTT

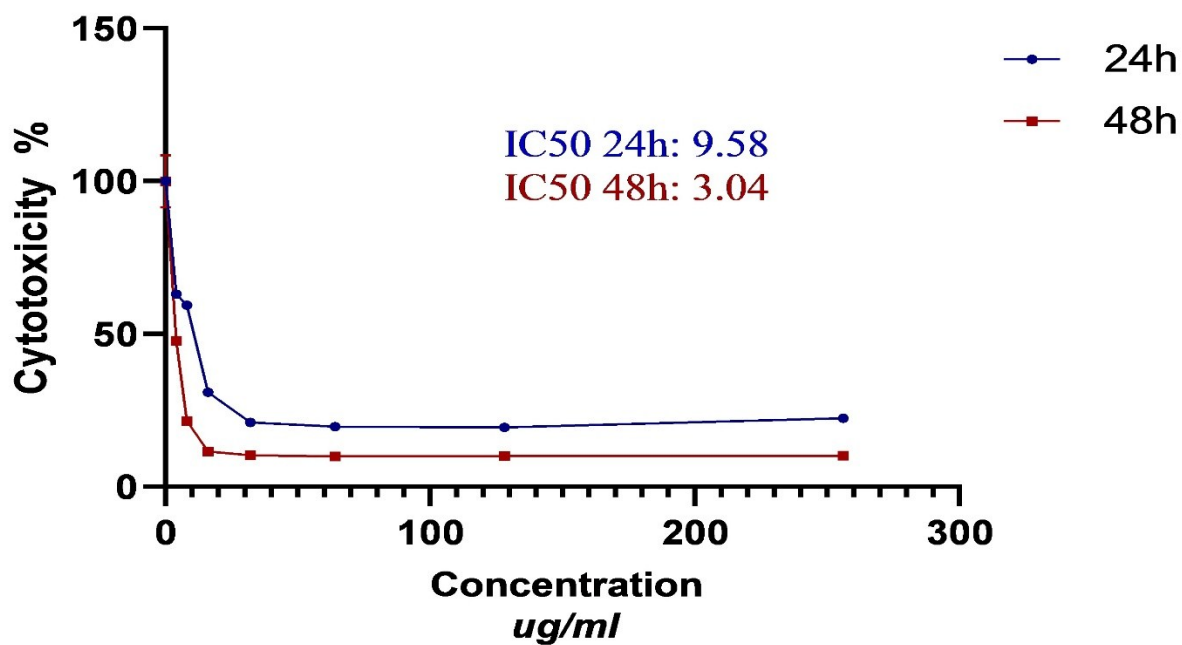
نمودارهای ۴-۷، ۴-۸ و ۴-۹ نتایج آزمون MTT را در سلول‌های CaSki, HeLa و HFFF2 نشان می‌دهند که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین (۰-۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در این نمودارها میزان زنده‌مانی سلولی (%) در برابر غلظت‌های مختلف دارو ($\mu\text{g/ml}$) رسم شده است. در مورد سیس پلاتین، مقادیر IC_{50} برای سلول‌های HeLa به ترتیب ۱۱,۰۱ و ۴,۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای سلول‌های CaSki به ترتیب ۹,۱۷ و ۳,۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای سلول‌های HFFF2 به ترتیب ۹,۵۸ و ۳,۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بود.



نمودار ۴-۷: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HeLa تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۴-۸: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CaSki تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

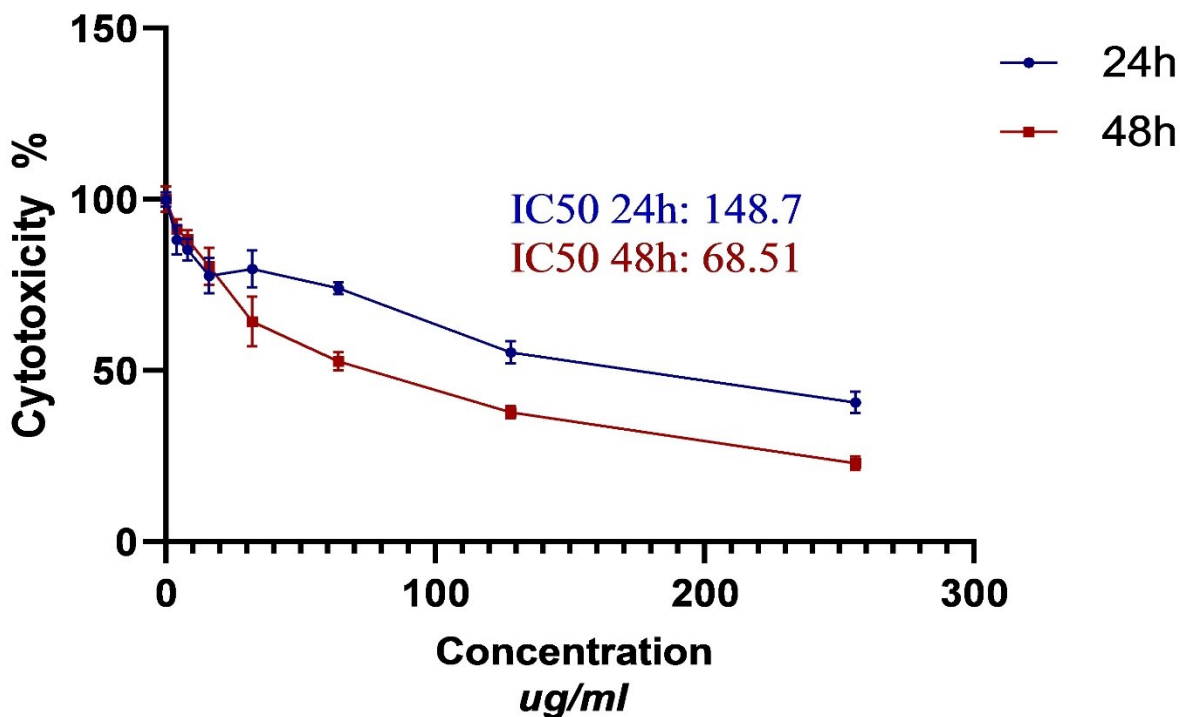


نمودار ۴-۹: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با سیس پلاتین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

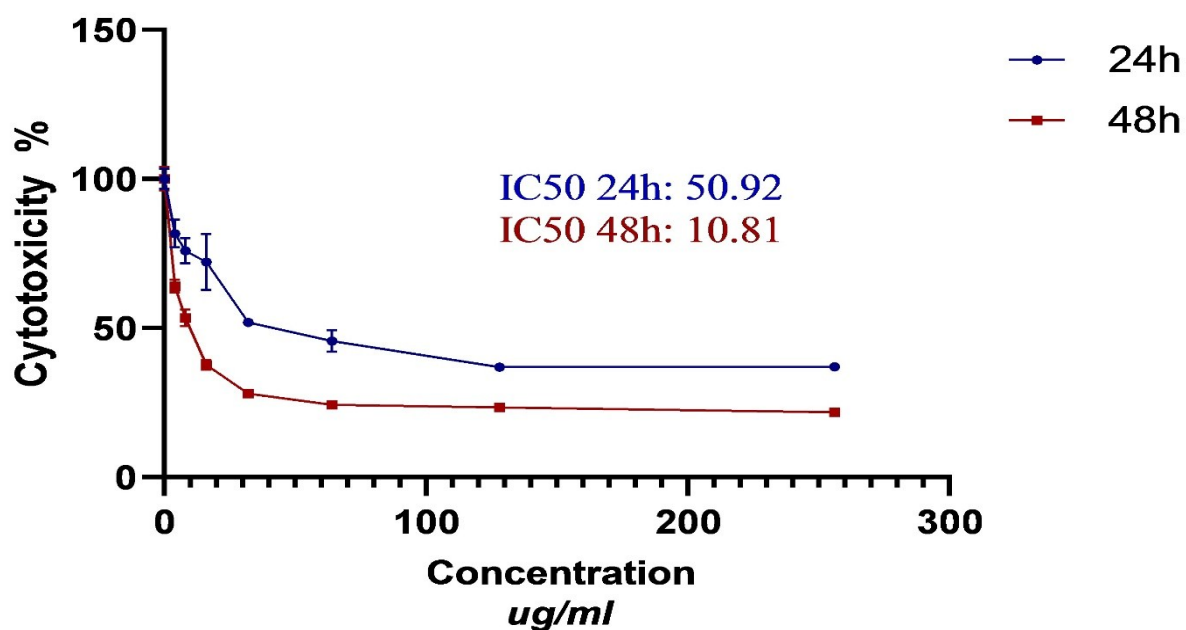
۴-۱-۱-۴ نتایج ارزیابی اثر ایرینوتکان بر زیست‌پذیری سلول‌های HeLa، CaSki و HFFF2 با استفاده از

آزمون MTT

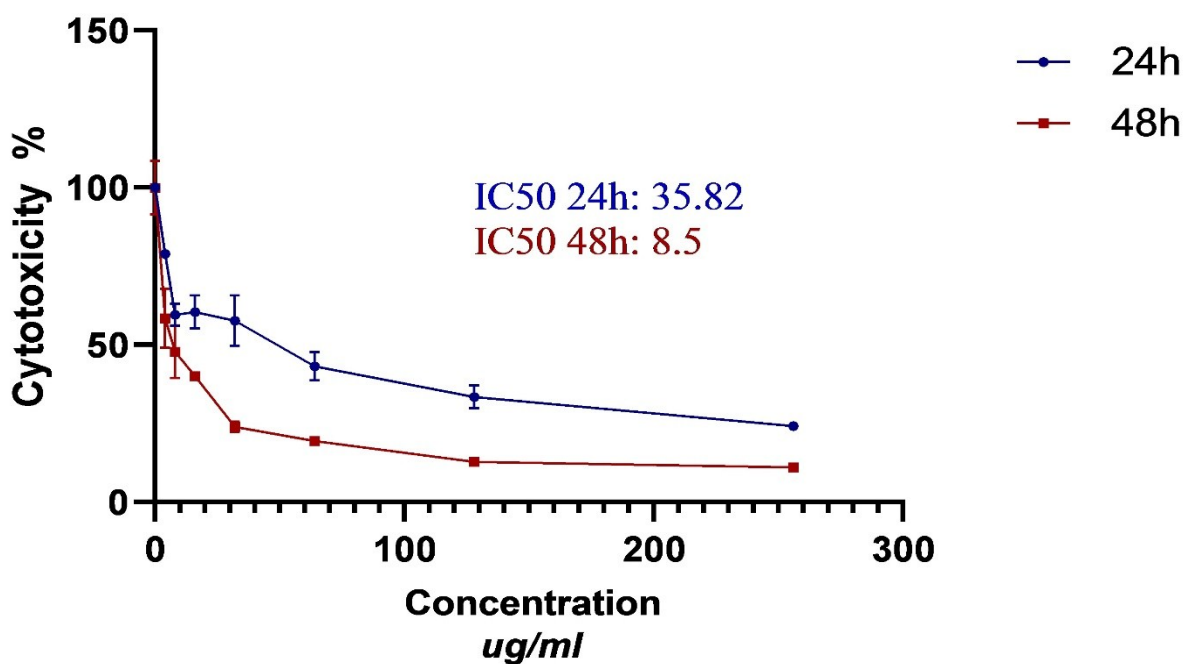
نمودارهای ۴-۱۰، ۴-۱۱ و ۴-۱۲ نتایج آزمون MTT را در سلول‌های HeLa، CaSki و HFFF2 نشان می‌دهند که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ایرینوتکان (۰-۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در این نمودارها میزان زنده‌مانی سلولی (%) در برابر غلظت‌های مختلف دارو ($\mu\text{g/ml}$) رسم شده است. برای ایرینوتکان، مقادیر IC_{50} برای ۲۴ ساعت در رده‌های سلولی HeLa، CaSki و HFFF2 به ترتیب ۱۴۸٫۷، ۵۰٫۹۲ و ۳۵٫۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین برای ۴۸ ساعت به ترتیب ۶۸٫۵۱، ۱۰٫۸۱ و ۸٫۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.



نمودار ۴-۱۰: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HeLa تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۴-۱۱: نمودار زنده‌مانی سلول‌های CaSki تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۴-۱۲: نمودار زنده‌مانی سلول‌های HFFF2 تیمار شده با ایرینوتکان پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت

۴-۲- نتایج ارزیابی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی ترکیبات دارویی بر اساس شاخص ترکیب (CI)

Cell Line	Combination no.	Combination dosage	Viability %	CI value
-----------	-----------------	--------------------	-------------	----------

۴-۲-۱- نتایج ارزیابی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی تیمار ترکیبی آتورواستاتین و ایرینوتکان بر رده‌های سلولی HeLa و CaSki

اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی تیمار ترکیبی آتورواستاتین و ایرینوتکان بر اساس مقادیر IC₁₀, 20, 30, 40, 50 که از سنجش MTT روی هر دو رده سلولی HeLa و CaSki به دست آمده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که همه نسبت های آتورواستاتین + ایرینوتکان دارای اثر سینرژیک ($CI < 1$) بر روی رده‌های سلولی HeLa و CaSki هستند به جز ترکیب IC₁₀ آتورواستاتین با IC₄₀ ایرینوتکان در سلول های HeLa که دارای اثر آنتاگونیستی ($CI > 1$) بودند.

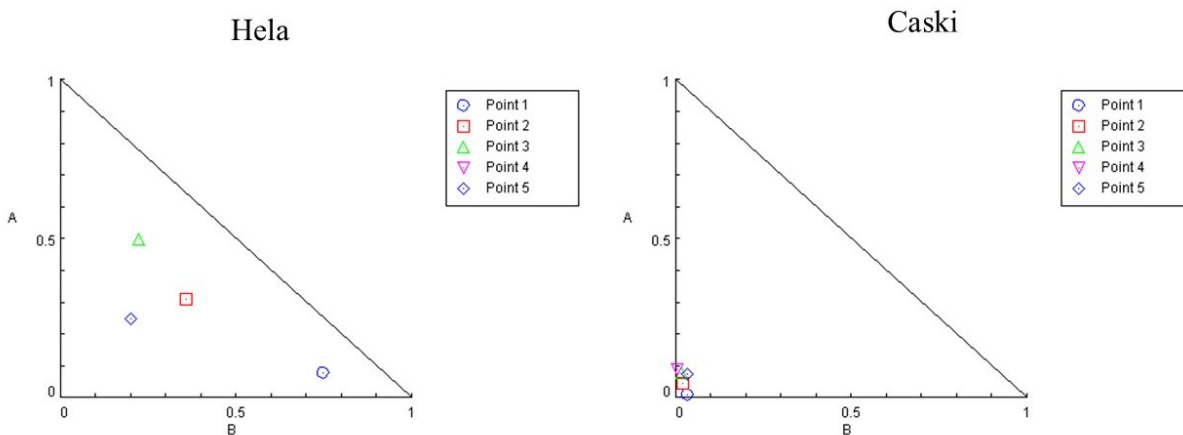
در رده‌های سلولی HeLa، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژیک است، با استفاده از ترکیب ۵ مشاهده شد که شامل ترکیب ایرینوتکان با غلظت IC₅₀ و آتورواستاتین با غلظت IC₅₀ بود. CI این ترکیب در رده سلولی HeLa برابر با ۰,۴۴ بود. و همچنین در رده‌های سلولی CaSki، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژیک است، با استفاده از ترکیب ۱ مشاهده شد که شامل ترکیب ایرینوتکان با غلظت IC₁₀ و آتورواستاتین با غلظت IC₄₀ بود. CI این ترکیب در رده سلولی CaSki برابر با ۰,۰۴ بود.

بر اساس این یافته‌ها، ترکیب ۵ در رده سلولی HeLa و ترکیب ۱ در CaSki، ترکیب بهینه هم افزایی را نشان داد که برای بررسی بیشتر در سایر آزمایش‌های تجربی انتخاب شد.

		Irinotecan	Atorvastatin		
		IC value ($\mu\text{g/mL}$)			
HeLa	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	57 %	0.82
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	54 %	0.66
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	54 %	0.72
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	64 %	1.47
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	33 %	0.44
CaSki	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	25 %	0.04
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	26 %	0.06
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	28 %	0.09
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	27 %	0.09
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	20 %	0.10

نمودار ۱۳-۴: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب آتورواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HeLa و CaSki

Iri + Atro



۴-۲-۲- نتایج بررسی اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین و ایرینوتکان بر رده‌های سلولی

CaSki و HeLa

اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین + ایرینوتکان بر اساس مقادیر IC_{10} , 20 , 30 , 40 که از سنجش MTT روی هر دو رده سلولی HeLa و CaSki به دست آمده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که همه ترکیبات سیمواستاتین + ایرینوتکان دارای اثر سینرژیک ($CI < 1$) بر روی رده سلولی CaSki هستند و در رده سلولی HeLa ترکیبات IC_{30} سیمواستاتین با IC_{20} ایرینوتکان و IC_{50} سیمواستاتین با IC_{50} ایرینوتکان دارای اثر سینرژیک ($CI < 1$) هستند و سایر ترکیبات در این رده سلولی دارای اثر آنتاگونیستی ($CI > 1$) بودند.

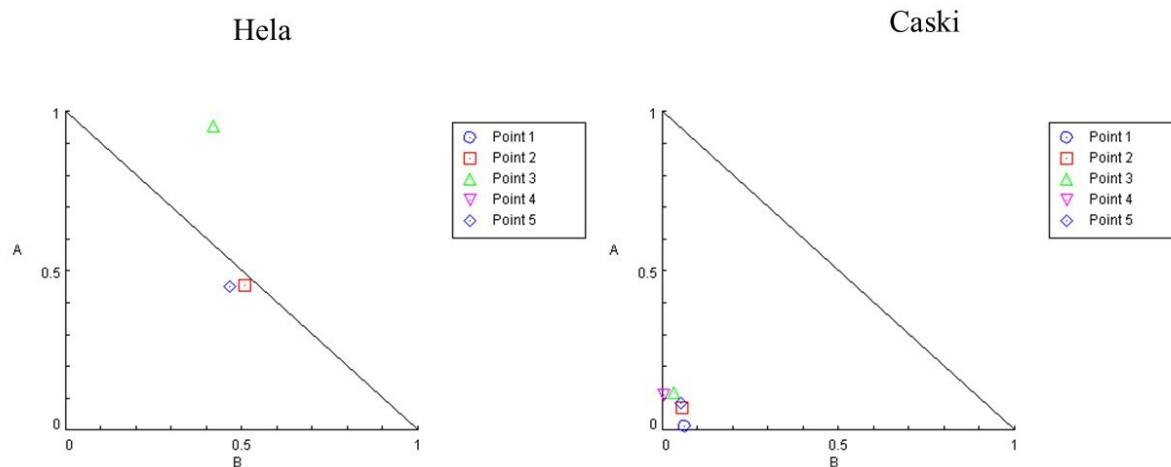
در رده‌های سلولی HeLa، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژسم است، با استفاده از ترکیب ۵ مشاهده شد که شامل ترکیب ایرینوتکان با غلظت IC_{50} و سیمواستاتین با غلظت IC_{50} بود. CI این ترکیب در رده سلولی HeLa برابر با ۰٫۹۲ بود. و همچنین در رده‌های سلولی CaSki، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژسم است، با استفاده از ترکیب ۱ مشاهده شد که شامل ترکیب ایرینوتکان با غلظت IC_{10} و سیمواستاتین با غلظت IC_{40} بود. CI این ترکیب در رده سلولی CaSki برابر با ۰٫۰۷ بود.

بر اساس این یافته‌ها، ترکیب ۵ در رده سلولی HeLa و ترکیب ۱ در CaSki، ترکیب بهینه هم‌افزایی را نشان داد که برای بررسی بیشتر در سایر آزمایش‌های تجربی انتخاب شد.

جدول ۳-۴: اثرات ترکیبی سیمواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HeLa و CaSki پس از ۲۴ ساعت تیمار

Cell Line	Combination no.	Combination dosage		Viability %	CI value
		Irinotecan	Simvastatin		
		IC value ($\mu\text{g/mL}$)	IC value ($\mu\text{g/mL}$)		
HeLa	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	64 %	1.73
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	60 %	0.96
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	64 %	1.37
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	68 %	1.97
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	42 %	0.92
CaSki	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	27 %	0.07
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	30 %	0.12
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	32 %	0.15
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	29 %	0.11
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	21 %	0.13

Iri + Sim



نمودار ۱۴-۴: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب سیمواستاتین و ایرینوتکان در سلول‌های HeLa و CaSki

Cell Line	Combination no.	Combination dosage		Viability %	CI value
		Cisplatin	Atorvastatin		
		IC value (μg/mL)	IC value (μg/mL)		
HeLa	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	45 %	0.42
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	51 %	0.69
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	58 %	1.42
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	60 %	1.69
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	33 %	0.55
CaSki	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	33 %	0.15
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	28 %	0.15
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	29 %	0.23
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	29 %	0.28

Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	14 %	0.03
---------	------------------	------------------	------	------

جدول ۴-۴: اثرات ترکیبی آتورواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HeLa و CaSki پس از ۲۴ ساعت تیمار

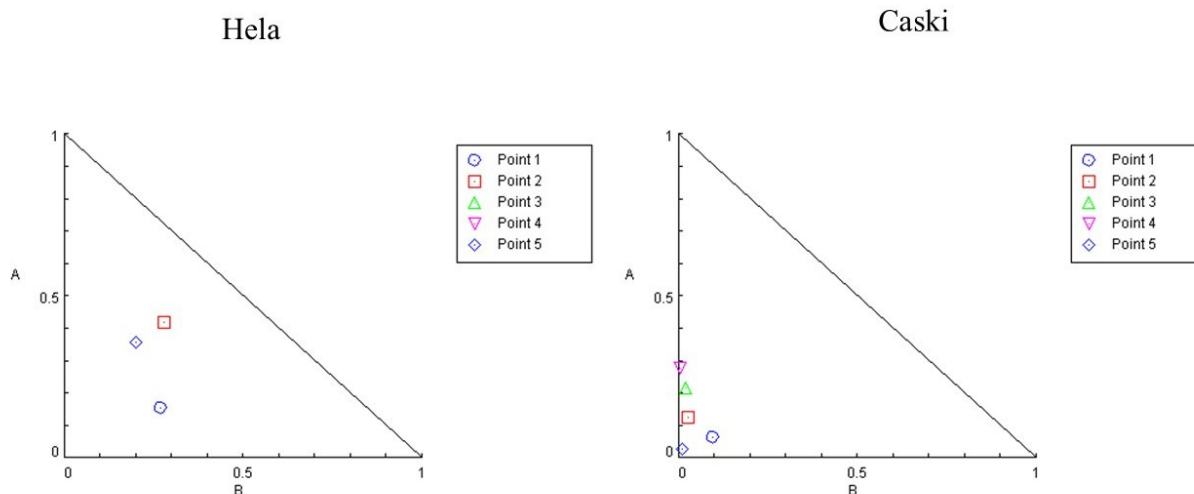
نمودار ۴-۱۵: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب آتورواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HeLa و CaSki

۴-۲-۳- نتایج بررسی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین و سیس پلاتین بر رده‌های

سلولی HeLa و CaSki

اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی ترکیب سیمواستاتین + سیس پلاتین بر اساس مقادیر IC₁₀, 20, 30, 40، MTT روی هر دو رده سلولی HeLa و CaSki به دست آمده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که همه ترکیبات سیمواستاتین + سیس پلاتین دارای اثر سینرژیک ($CI < 1$) بر روی رده سلولی CaSki هستند و در رده سلولی HeLa ترکیبات IC₄₀ سیمواستاتین با IC₁₀ سیس پلاتین و IC₃₀ سیمواستاتین با IC₂₀ سیس پلاتین دارای اثر سینرژیک ($CI < 1$) هستند و سایر ترکیبات در این رده

Cis + Atro



سلولی دارای اثر آنتاگونیستی ($CI > 1$) بودند.

در رده‌های سلولی HeLa، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژیک است، با استفاده از ترکیب ۱ مشاهده شد که شامل ترکیب سیس پلاتین با غلظت IC₁₀ و سیمواستاتین با غلظت

IC40 بود. CI این ترکیب در رده سلولی HeLa برابر با ۰,۶۱ بود. و همچنین در رده‌های سلولی CaSki

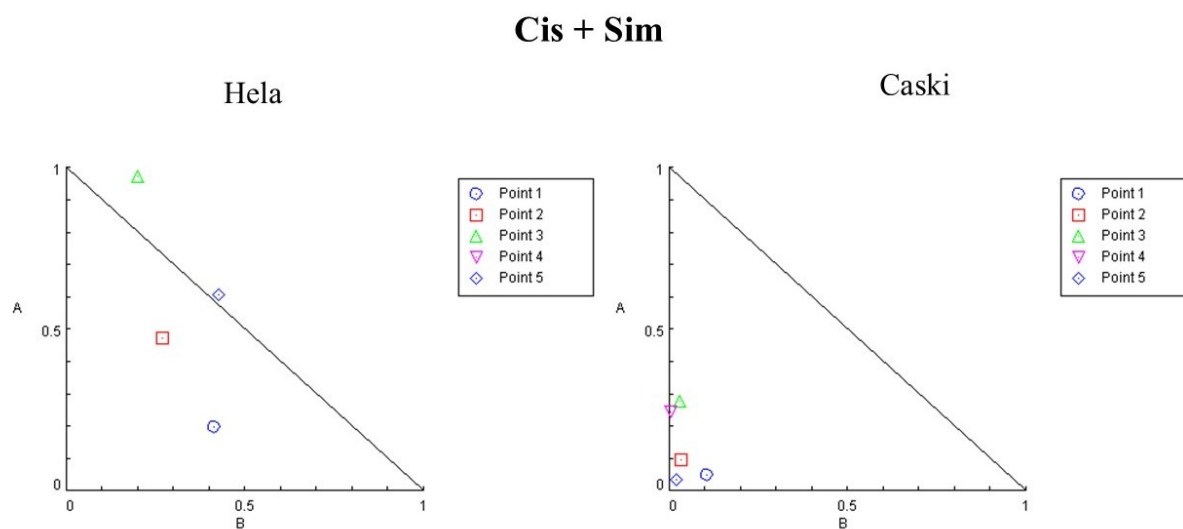
Cell Line	Combination no.	Combination dosage	Viability %	CI value
-----------	--------------------	--------------------	-------------	----------

، کمترین شاخص ترکیبی که نشان دهنده قوی‌ترین ترکیب سینرژسم است، با استفاده از ترکیب ۵ مشاهده شد که شامل ترکیب سیس پلاتین با غلظت IC50 و سیمواستاتین با غلظت IC50 بود. CI این ترکیب در رده سلولی CaSki برابر با ۰,۰۵ بود. بر اساس این یافته‌ها، ترکیب ۱ در رده سلولی HeLa و ترکیب ۵ در CaSki ، ترکیب بهینه هم افزایی را نشان داد که برای بررسی بیشتر در سایر آزمایش‌های تجربی انتخاب شد.

		Cisplatin	Simvastatin		
		IC value ($\mu\text{g/mL}$)	IC value ($\mu\text{g/mL}$)		
Hela	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	49	0.61
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	53	0.74
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	56	1.17
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	58	1.48
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	41	1.03
CaSki	Comb. 1	IC ₁₀	IC ₄₀	31	0.15
	Comb. 2	IC ₂₀	IC ₃₀	26	0.13
	Comb. 3	IC ₃₀	IC ₂₀	31	0.30
	Comb. 4	IC ₄₀	IC ₁₀	28	0.24
	Comb. 5	IC ₅₀	IC ₅₀	15	0.05

جدول ۴-۵: اثرات ترکیبی سیمواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HeLa و CaSki پس از ۲۴ ساعت تیمار

نمودار ۴-۱۶: نمودار اثر سینرژیستی ترکیب سیمواستاتین و سیس پلاتین در سلول‌های HeLa و CaSki



۳-۴- نتایج ارزیابی میزان القای آپوپتوز در رده‌های سلولی HeLa و CaSki با استفاده از فلوسایتومتری

۳-۴-۱- نتایج بررسی القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های HeLa تیمار شده با آتورواستاتین، سیمواستاتین،

سیس‌پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبی

برای ارزیابی تأثیر آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین بر میزان القای آپوپتوز و نکروز سلول‌های HeLa، سلول‌ها با مقادیر IC50 هر دارو و ترکیبات منتخب تیمار شده و سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده به صورت dot plot چهار ناحیه‌ای تحلیل شد.

نمودارهای ۱۷-۴ توزیع سلول‌های HeLa را در هشت گروه مختلف پس از رنگ‌آمیزی با Annexin V-FITC/PI نشان می‌دهند. محور (FL3) x نشان‌دهنده شدت PI (سلول‌های نکروتیک) و محور (FL1) y نشان‌دهنده شدت Annexin V (سلول‌های آپپتوتیک) می‌باشد. معنای هر ناحیه در جدول زیر مشخص شده است:

جدول ۴-۶: معانی کوارترهای Q1 تا Q4 در نمودار Dot Plot فلوسایتومتری

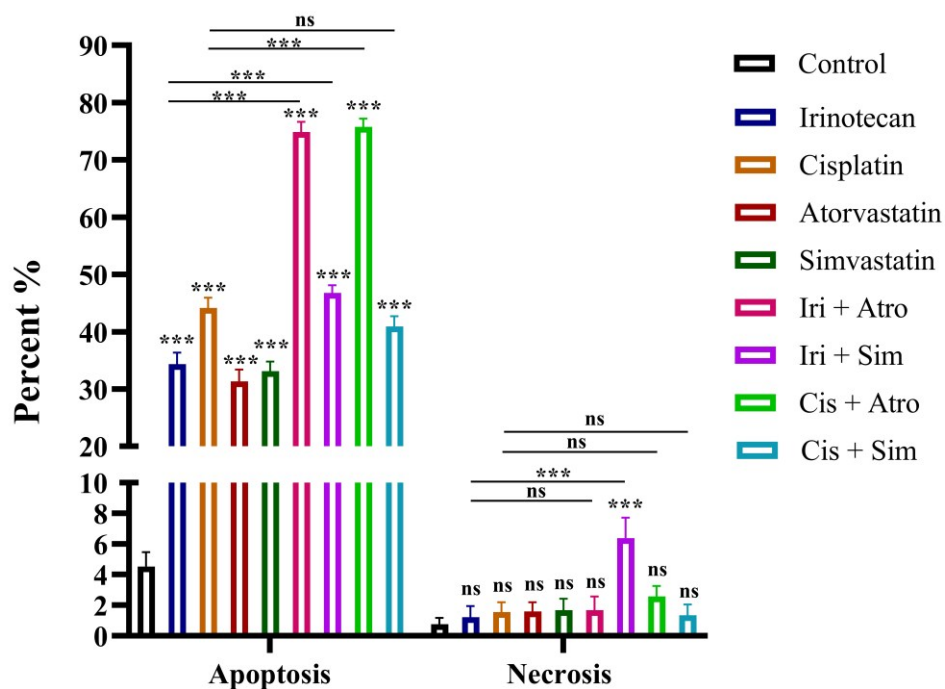
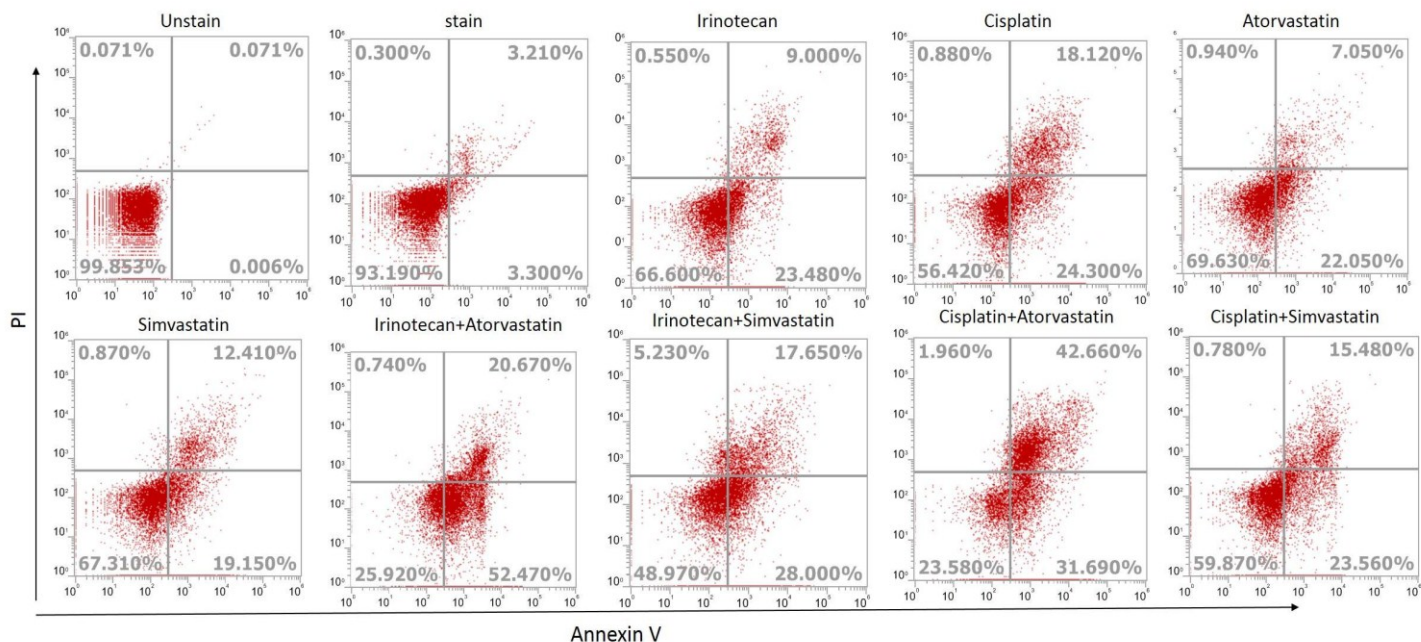
وضعیت سلول	PI	Annexin V	ربع
نکروز (مرگ سلولی غیر آپپتوتیک)	مثبت	منفی	Q1
آپپتوز نهایی (late apoptosis)	مثبت	مثبت	Q2
آپپتوز اولیه (early apoptosis)	منفی	مثبت	Q3
سلول زنده (viable cells)	منفی	منفی	Q4

در سلول‌های HeLa، میزان آپپتوز اولیه (Annexin V+/PI-) برای ایرینوتکان ۲۳،۴۸٪، برای سیس پلاتین ۲۴،۳٪، برای آتورواستاتین ۲۲،۰۵٪ و برای سیمواستاتین ۱۹،۱۵٪ بود، در حالی که میزان آپپتوز دیررس (Annexin V+/PI+) به ترتیب ۹٪، ۱۸،۱۲٪، ۷،۰۵٪ و ۱۲،۴۱٪ بود. درصد کل آپپتوز (اولیه +

دیررس) برای ایرینوتکان ۳۲,۴۸٪، برای برای سیس پلاتین ۴۲,۴۲٪، برای آتورواستاتین ۲۹,۰۱٪ و برای سیمواستاتین ۳۱,۵۶٪ بود. همبستگی معنی‌داری بین آپوتوز کل در تمام گروه‌های مونوتراپی در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$).

در سلول‌های HeLa، ترکیبات ایرینوتکان +آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین +آتورواستاتین و سیس پلاتین +سیمواستاتین به ترتیب منجر به ۷۳,۱۴٪، ۴۵,۶۵٪، ۷۴,۳۵٪ و ۳۹,۰۴٪ آپوتوز کل، ۲۰,۶۷٪، ۱۷,۶۵٪، ۴۲,۶۶٪ و ۱۵,۴۸٪ آپوتوز دیررس و ۵۲,۴۷٪، ۲۸٪، ۳۱,۶۹٪ و ۲۳,۵۶٪ آپوتوز اولیه شد که افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود ($p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$). و همینطور همبستگی معنی‌داری در آپوتوز کل بین ترکیب ایرینوتکان +آتورواستاتین و ایرینوتکان ($p\text{-value} < 0.001$)، ترکیب ایرینوتکان + سیمواستاتین و ایرینوتکان به تنهایی ($p\text{-value} < 0.001$) و همچنین ترکیب سیس پلاتین +آتورواستاتین و سیس پلاتین به تنهایی ($p\text{-value} < 0.001$) وجود دارد.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان با موفقیت آپوتوز را القا می‌کنند، اثرات هم‌افزایی آتورواستاتین در ترکیب با ایرینوتکان و سیس پلاتین و همچنین سیمواستاتین با ایرینوتکان و سیس پلاتین همراه با پاسخ آپوتوز کل به طور قابل توجهی بالاتر است.



نمودار ۴-۱۷: میزان آپوپتوز و نکروز سلول های سرطانی HeLa بعد از تیمار با هشت گروه

درمانی بوسیله تکنیک فلوسایتومتری

۴-۳-۲- نتایج بررسی القای آپوپتوز و نکروز در سلول‌های CaSki تیمار شده با آتورواستاتین، سیمواستاتین،

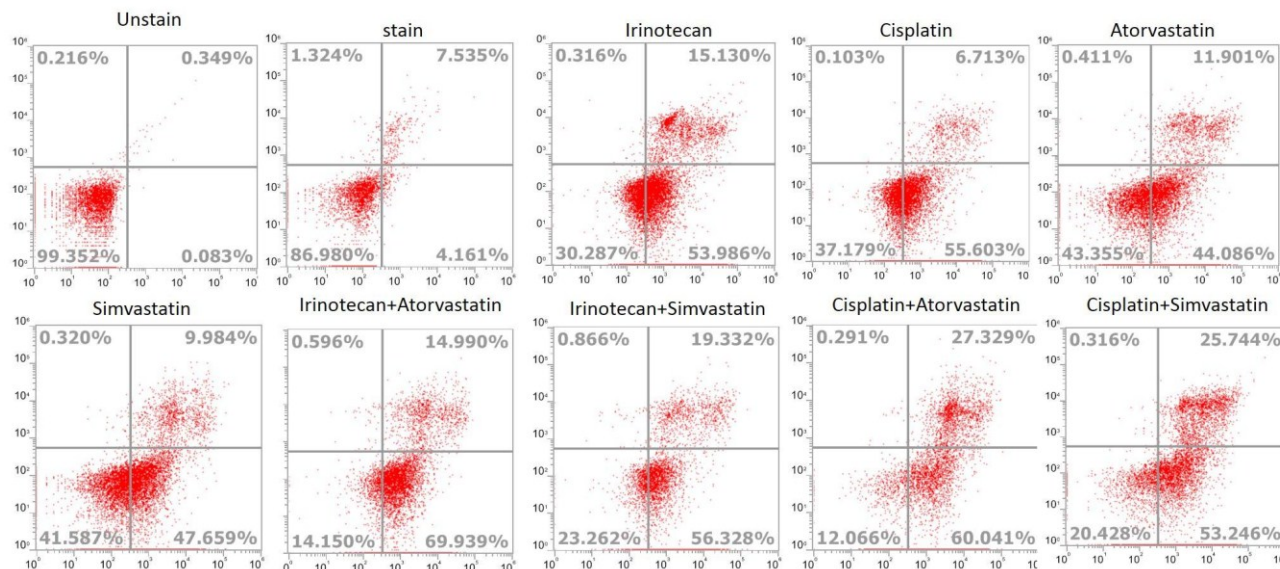
سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبی

برای ارزیابی تأثیر آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان به صورت منفرد و ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین بر میزان القای آپوپتوز و نکروز سلول‌های CaSki، سلول‌ها با مقادیر IC50 هر دارو و ترکیبات منتخب تیمار شده و سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI و فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده به صورت dot plot چهار ناحیه‌ای تحلیل شد.

نمودارهای ۱۸-۴ توزیع سلول‌های CaSki را در هشت گروه مختلف پس از رنگ‌آمیزی با Annexin V-FITC/PI نشان می‌دهند. محور x (FL3) نشان‌دهنده شدت PI (سلول‌های نکروتیک) و محور y (FL1) نشان‌دهنده شدت Annexin V (سلول‌های آپوپتوتیک) می‌باشد.

در سلول‌های CaSki، میزان آپوپتوز اولیه (Annexin V+/PI-) برای ایرینوتکان ۵۳٫۹۸٪، برای سیس پلاتین ۵۵٫۶٪، برای آتورواستاتین ۴۴٫۰۸٪ و برای سیمواستاتین ۴۷٫۶۵٪ بود، در حالی که میزان آپوپتوز دیررس (Annexin V+/PI+) به ترتیب ۱۵٫۱۳٪، ۶٫۷۱٪، ۱۱٫۹٪ و ۹٫۹۸٪ بود. درصد کل آپوپتوز (اولیه + دیررس) برای ایرینوتکان ۶۹٫۱۱٪، برای سیس پلاتین ۶۲٫۳۱٪، برای آتورواستاتین ۵۵٫۹۸٪ و برای سیمواستاتین ۵۷٫۶۴٪ بود. همبستگی معنی‌داری بین آپوپتوز کل در تمام گروه‌های مونوتراپی در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$).

در سلول‌های CaSki، ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین به ترتیب منجر به ۸۴٫۹۲٪، ۷۵٫۶۶٪، ۸۷٫۳۷٪ و ۷۸٫۹۹٪ آپوپتوز کل، ۱۴٫۹۹٪، ۱۹٫۳۳٪، ۲۷٫۳۲٪ و ۲۵٫۷۴٪ آپوپتوز دیررس و ۶۹٫۹۳٪، ۵۶٫۳۲٪، ۶۰٫۰۴٪ و ۵۳٫۲۴٪ آپوپتوز اولیه شد که افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود ($p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$, $p\text{-value} < 0.001$) و همینطور همبستگی معنی‌داری در

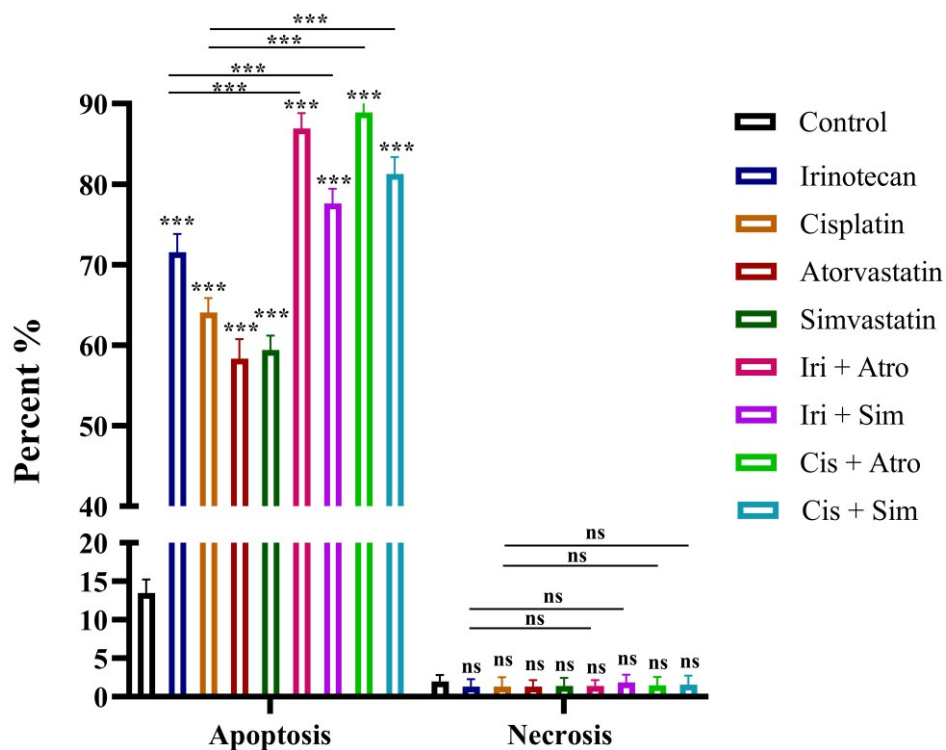


آپوتوز کل بین ترکیب ایرینوتکان + آتورواستاتین و ایرینوتکان ($p\text{-value} < 0.001$)، ترکیب ایرینوتکان + سیمواستاتین و ایرینوتکان به تنهایی ($p\text{-value} < 0.001$) و همچنین ترکیب سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین به تنهایی ($p\text{-value} < 0.001$) و ترکیب سیس پلاتین + سیمواستاتین و سیس پلاتین به تنهایی ($p\text{-value} < 0.001$) وجود دارد.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس پلاتین و ایرینوتکان با موفقیت آپوتوز را القا می‌کنند، اثرات هم‌افزایی آتورواستاتین در ترکیب با ایرینوتکان و سیس پلاتین و همچنین سیمواستاتین با ایرینوتکان و سیس پلاتین همراه با پاسخ آپوتوز کل به طور قابل توجهی بالاتر است.

نمودار ۴-۱۸: میزان آپوپتوز و نکروز سلول های سرطانی HeLa بعد از تیمار با هشت گروه

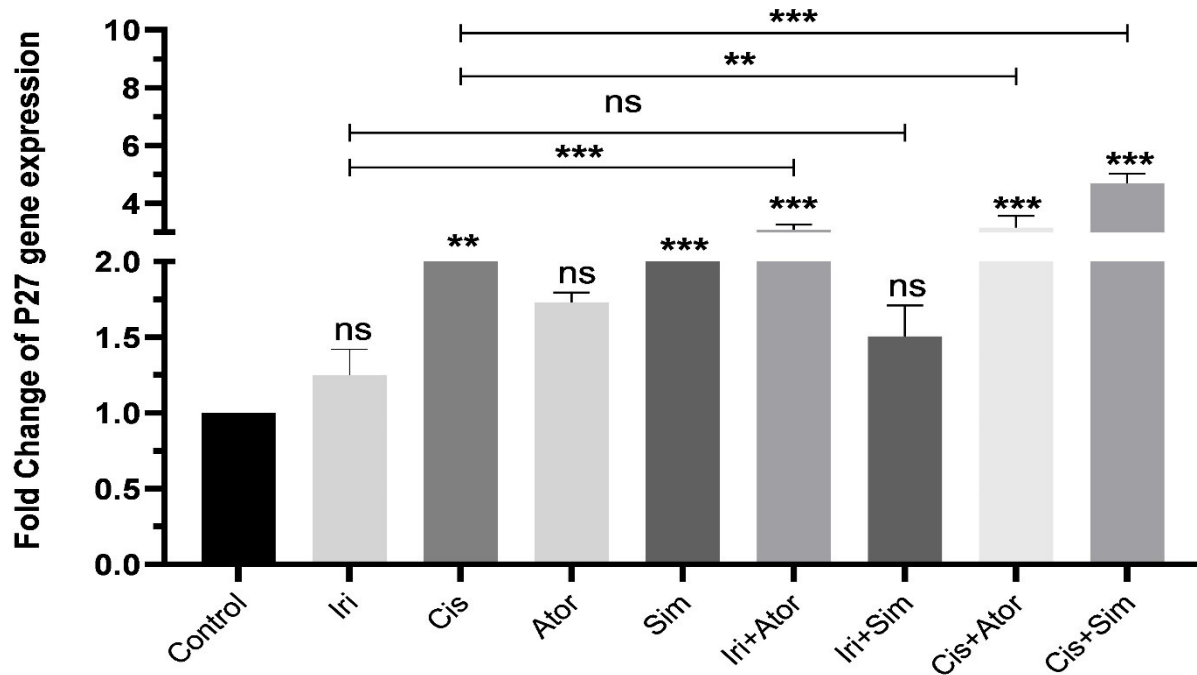
درمانی بوسیله تکنیک فلوسایتومتری



۴-۴- نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمارهای دارویی

۴-۴-۱- تغییرات بیان ژن CDKN1B (P27) در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس‌پلاتین و ایرینوتکان

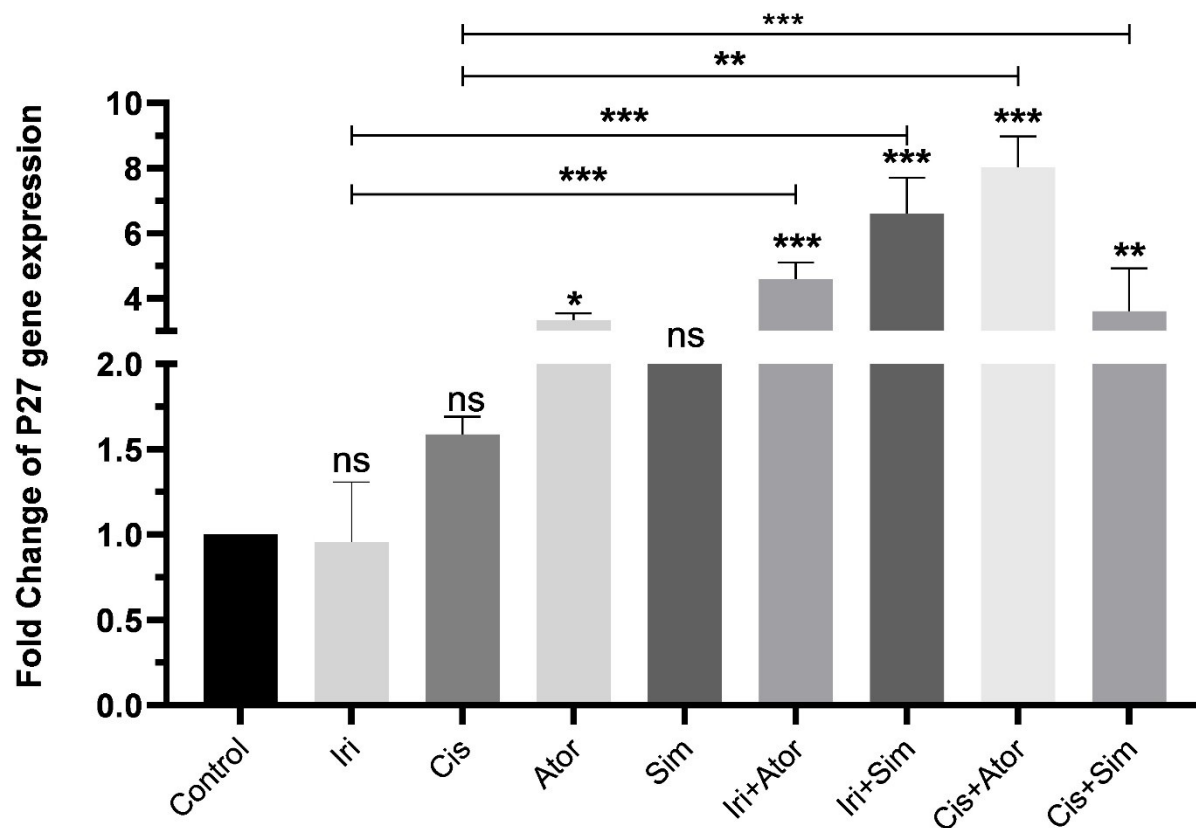
مطابق نتایج این مطالعه، بیان ژن CDKN1B (P27) در پاسخ به تیمارهای تک‌دارویی افزایش یافت. در رده سلولی HeLa، تیمار با ایرینوتکان، آتورواستاتین، سیس‌پلاتین و سیمواستاتین موجب افزایش بیان این ژن شد که این افزایش در تیمار با سیس‌پلاتین و سیمواستاتین از نظر آماری معنی‌دار بود (به ترتیب، $p < 0.01$ و $p < 0.001$). ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، سیس‌پلاتین + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + سیمواستاتین موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن P27 شده‌اند. (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ ، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.001$). در این رده سلولی میزان بیان P27 تحت تیمار با ایرینوتکان + آتورواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p\text{-value} < 0.001$) و همچنین میزان بیان P27 تحت تیمار با سیس‌پلاتین + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس‌پلاتین به طور معنی‌داری افزایش یافته بود (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.01$ و $p\text{-value} < 0.001$).



نمودار ۱۹-۴: میزان بیان CDKN1B (P27) در رده سلولی HeLa تیمار شده با گروه های دارویی در مقایسه با گروه کنترل

(: نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی دار است "ns". $***p < 0.001$ and $**p < 0.01$ and $*p < 0.05$)

در سلول های CaSki ، تیمار با سیس پلاتین و سیمواستاتین موجب افزایش بیان این ژن شد ولی این افزایش معنادار نبود، و همینطور تیمار با آتورواستاتین باعث افزایش معنی دار بیان این ژن شده است ($p < 0.05$). ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن P27 شده اند. (به ترتیب، $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.01$). در این رده سلولی میزان بیان P27 تحت تیمار با ایرینوتکان + آتورواستاتین و ایرینوتکان + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان به طور معنی داری افزایش یافته بود ($p < 0.001$ و $p < 0.001$) و همچنین میزان بیان P27 تحت تیمار با سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس پلاتین به طور معنی داری افزایش یافته بود (به ترتیب، $p < 0.01$ و $p < 0.001$).



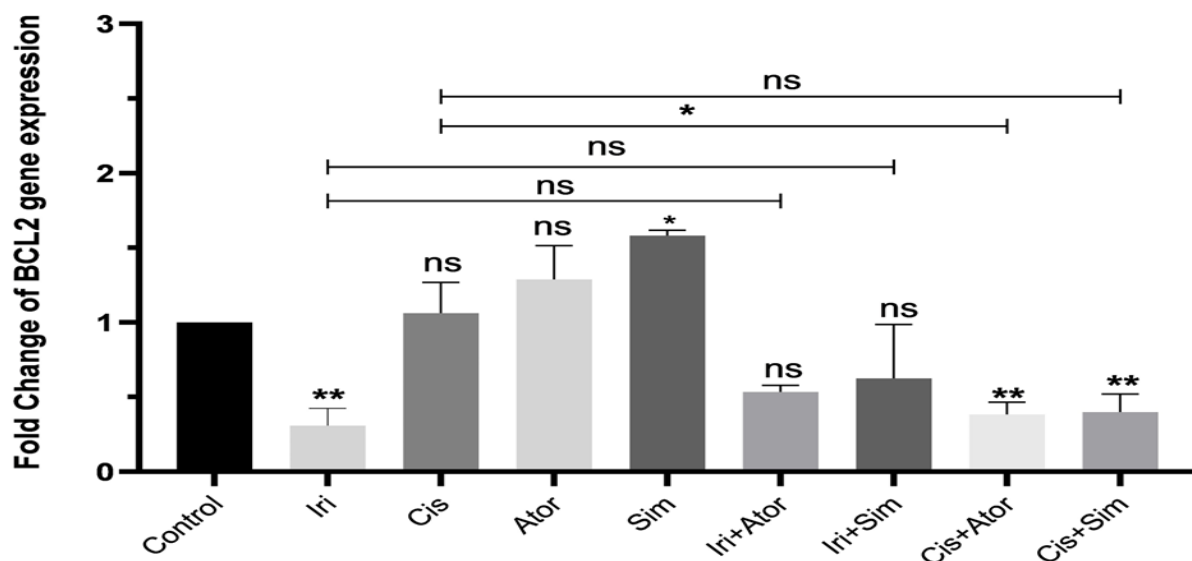
نمودار ۲۰-۴: میزان بیان CDKN1B (P27) در رده سلولی CaSki تیمار شده با گروه های دارویی در

مقایسه با گروه کنترل

("ns": $p < 0.001$ and $p < 0.01$, $p < 0.05$: نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی دار است)

۴-۴-۲- تغییرات بیان ژن BCL2 در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس‌پلاتین و ایرینوتکان

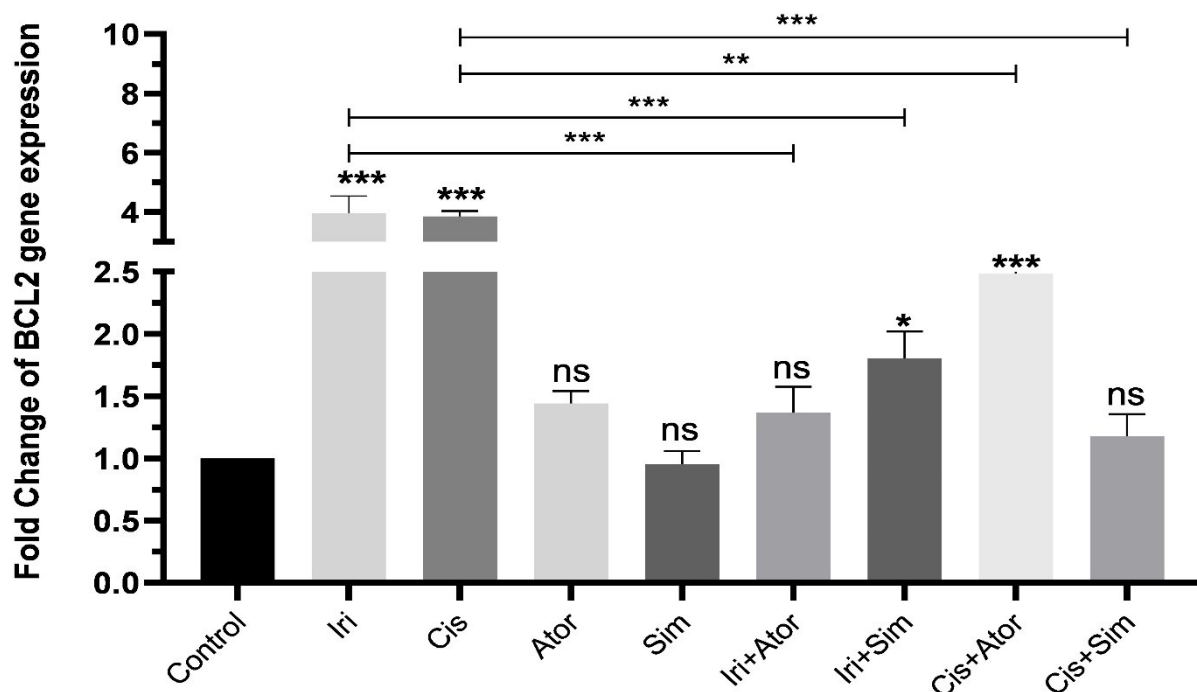
بیان Bcl2 پاسخ‌های متفاوتی به تیمارهای تک‌دارویی نشان داد. در سلول‌های HeLa، تیمار با سیس‌پلاتین و آتورواستاتین موجب افزایش بیان این ژن شد، و همین‌طور تیمار با سیمواستاتین باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن شده است ($p\text{-value} < 0.05$) در حالیکه تیمار با ایرینوتکان باعث کاهش معنی‌دار بیان این ژن شده است ($p\text{-value} < 0.01$). ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین باعث کاهش بیان ژن Bcl2 و همین‌طور ترکیبات سیس‌پلاتین + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + سیمواستاتین موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن Bcl2 شده‌اند (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.01$ و $p\text{-value} < 0.01$). در این رده سلولی میزان بیان Bcl2 تحت تیمار با ایرینوتکان + آتورواستاتین و ایرینوتکان + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان ارتباط معنی‌داری وجود نداشت؛ در حالیکه میزان بیان Bcl2 تحت تیمار با سیس‌پلاتین + آتورواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس‌پلاتین به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p\text{-value} < 0.05$).



نمودار ۴-۲۱: میزان بیان Bcl2 در رده سلولی HeLa تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل

(*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی‌دار است)

در سلول‌های CaSki، تیمار با ایرینوتکان و سیس پلاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن Bcl2 شد (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.001$)، و همینطور تیمار با آتورواستاتین باعث افزایش بیان این ژن شده است. ترکیبات ایرینوتکان + سیمواستاتین و سیس پلاتین + آتورواستاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن Bcl2 شده اند. (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.05$ و $p\text{-value} < 0.001$). در این رده سلولی میزان Bcl2 تحت تیمار با ایرینوتکان + آتورواستاتین و ایرینوتکان + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان به طور معنی داری کاهش یافته بود ($p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.001$) و همچنین میزان بیان Bcl2 تحت تیمار با سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس پلاتین به طور معنی داری کاهش یافته بود (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.01$ و $p\text{-value} < 0.001$).



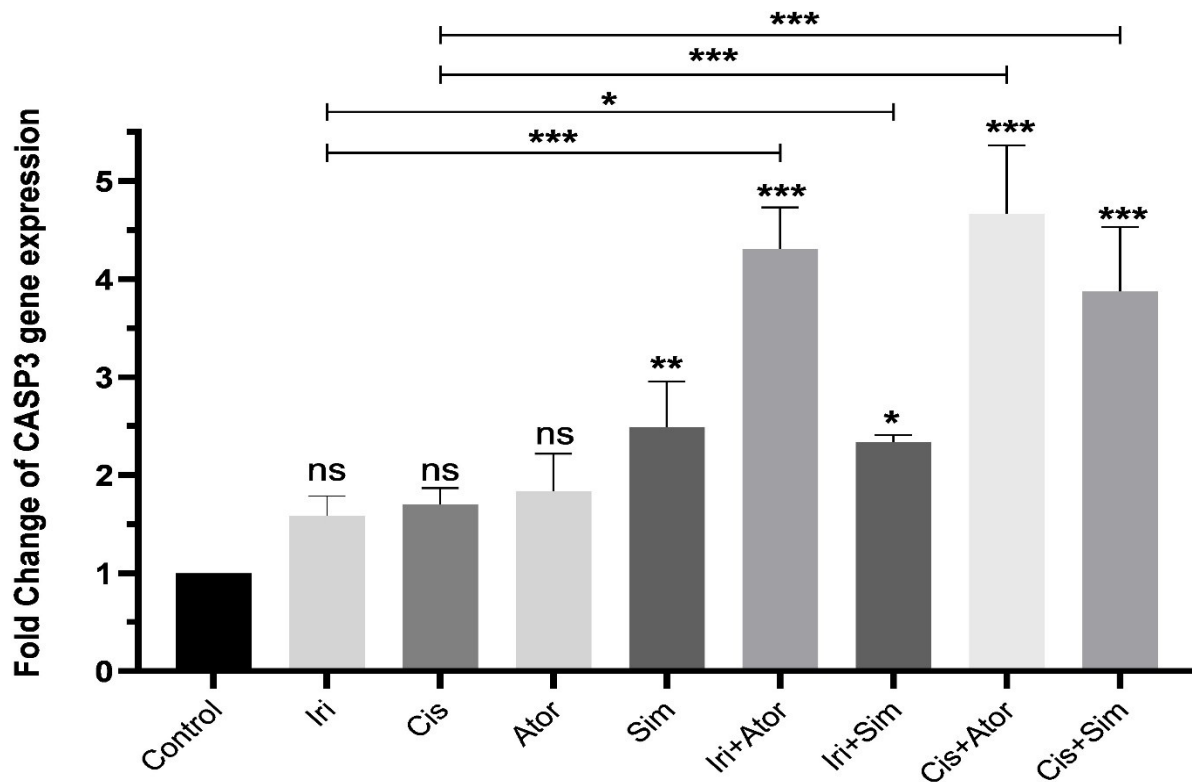
نمودار ۲۲-۴: میزان بیان Bcl2 در رده سلولی CaSki تیمار شده با گروه‌های دارویی در مقایسه با گروه کنترل

("ns") $p < 0.001$ and $p < 0.01$ **، $p < 0.05$ *: نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی دار است)

۴-۳- تغییرات بیان ژن CASP3 در رده‌های سلولی HeLa و CaSki پس از تیمار منفرد و ترکیبی با

آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیس‌پلاتین و ایرینوتکان

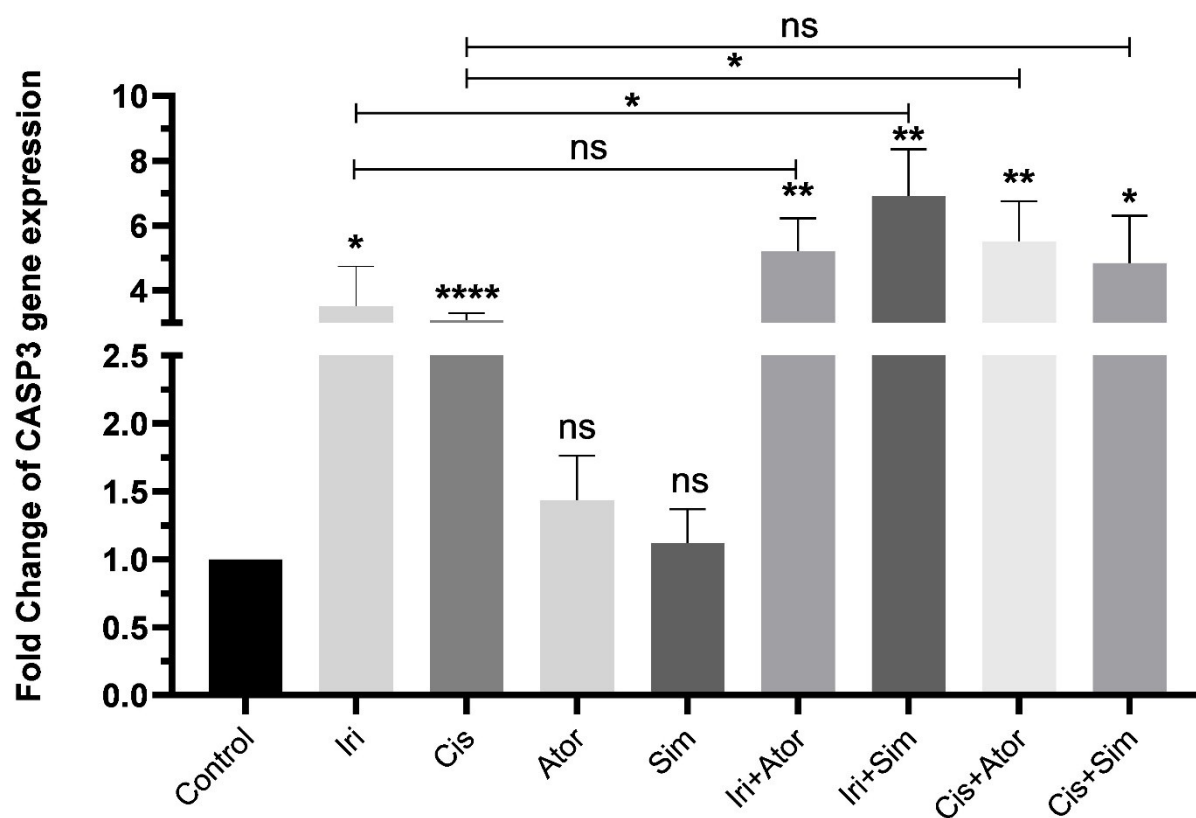
در سلول‌های HeLa، تیمار با ایرینوتکان، سیس‌پلاتین و آتورواستاتین موجب افزایش بیان این ژن شد، و همینطور تیمار با سیمواستاتین باعث افزایش معنی دار بیان این ژن شده است ($p\text{-value} < 0.01$). ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین باعث افزایش معنی دار بیان ژن Caspas3 (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.05$) و همینطور ترکیبات سیس‌پلاتین + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + سیمواستاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن Caspas3 شده اند (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.001$). در این رده سلولی میزان بیان Caspas3 تحت تیمار با ایرینوتکان + آتورواستاتین و ایرینوتکان + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان ارتباط معنی داری وجود داشت (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.05$)؛ و همینطور میزان بیان Caspas3 تحت تیمار با سیس‌پلاتین + آتورواستاتین و سیس‌پلاتین + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس‌پلاتین به طور معنی داری افزایش یافته بود به ترتیب، $p\text{-value} < 0.001$ و $p\text{-value} < 0.001$).



نمودار ۲۳-۴: میزان بیان Caspas3 در رده سلولی HeLa تیمار شده با گروه های دارویی در مقایسه با گروه کنترل

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. "ns") نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی دار است)

در سلول های CaSki، تیمار با ایرینوتکان و سیس پلاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن Caspas3 شد (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.05$ و $p\text{-value} < 0.0001$)، و همینطور تیمار با آتورواستاتین و سیمواستاتین باعث افزایش بیان این ژن شده است. ترکیبات ایرینوتکان + آتورواستاتین، ایرینوتکان + سیمواستاتین، سیس پلاتین + آتورواستاتین و سیس پلاتین + سیمواستاتین موجب افزایش معنی دار بیان ژن Caspas3 شده اند. (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.01$ ، $p\text{-value} < 0.01$ ، $p\text{-value} < 0.01$ و $p\text{-value} < 0.05$). در این رده سلولی میزان بیان Caspas3 تحت تیمار با ایرینوتکان + سیمواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با ایرینوتکان به طور معنی داری افزایش یافته بود ($p\text{-value} < 0.05$) و همچنین میزان بیان Caspas3 تحت تیمار با سیس پلاتین + آتورواستاتین در مقایسه با تیمار تکی با سیس پلاتین به طور معنی داری افزایش یافته بود (به ترتیب، $p\text{-value} < 0.05$).



نمودار ۲۴-۴: میزان بیان Caspas3 در رده سلولی CaSki تیمار شده با گروه های دارویی در مقایسه با گروه کنترل

("ns": $p < 0.001$ and $p < 0.01$, $p < 0.05$: * نشان دهنده عدم تفاوت آماری معنی دار است)

فصل پنجم: بحث و

نتیجه گیری

۵-۱: بحث

سرطان دهانه رحم همچنان یکی از مهم‌ترین بدخیمی‌های زنان است و مقاومت دارویی یا پاسخ ناکافی به درمان‌های رایج، از جمله سیس‌پلاتین و ایرینوتکان، ضرورت بررسی راهبردهای درمانی ترکیبی را افزایش داده است. در این زمینه، استاتین‌ها، از جمله آتورواستاتین و سیمواستاتین، علاوه بر اثرات متابولیک شناخته‌شده، می‌توانند مسیرهای مرتبط با تکثیر، چرخه سلولی و آپوپتوز را تحت تأثیر قرار دهند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سایتوتوکسیک داروهای منفرد و ترکیبی در رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم HeLa و CaSki و مقایسه آن‌ها با سلول نرمال HFFF2 انجام شد. همچنین تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و کنترل چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های کلی مطالعه نشان داد که داروهای مورد بررسی به‌صورت وابسته به دوز و زمان موجب کاهش زنده‌مانی سلولی شدند و ترکیبات دارویی، به‌ویژه آتورواستاتین همراه با ایرینوتکان یا سیس‌پلاتین، اثرات هم‌افزای بیشتری ایجاد کردند. در بررسی اثر داروهای منفرد، هر چهار ترکیب شامل سیس‌پلاتین، ایرینوتکان، سیمواستاتین و آتورواستاتین توانستند زنده‌مانی سلول‌های HeLa و CaSki را کاهش دهند. با این حال، IC_{50} پایین‌تر سیس‌پلاتین در هر دو رده سلولی نشان‌دهنده قدرت بیشتر اثر سایتوتوکسیک مستقیم این دارو بود. سیس‌پلاتین با ایجاد اتصالات عرضی درون‌رشته‌ای و بین‌رشته‌ای DNA، همانندسازی و رونویسی را مختل کرده و در صورت فراتر رفتن آسیب از ظرفیت ترمیم سلول، می‌تواند توقف چرخه سلولی و آپوپتوز را القا کند. فعال‌شدن کاسپازهای ۳، ۷ و ۹ نیز در سلول‌های سرطان دهانه رحم در پاسخ به سیس‌پلاتین گزارش شده است. ایرینوتکان نیز از طریق مهار توپوایزومراز I موجب ایجاد آسیب DNA می‌شود، اگرچه نوع آسیب اولیه آن با سیس‌پلاتین متفاوت است (۸۰). در مطالعه حاضر، کاهش وابسته به زمان و دوز زنده‌مانی پس از تیمار با ایرینوتکان و کاهش IC_{50} در هر دو رده سلولی، با این اثر ضدتکثیری سازگار بود. تبدیل ایرینوتکان به

متابولیت فعال SN-38، مهار توپوایزومرلز I و اختلال در اتصال مجدد DNA از مکانیسم‌های اصلی اثر این دارو هستند (۸۱). همچنین افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال در مسیرهای بقایی مانند PI3K/Akt و MAPK می‌توانند در کاهش زنده‌مانی و القای آپوپتوز نقش داشته باشند (۸۲، ۸۳).

در مقابل، اثرات استاتین‌ها عمدتاً با مهار مسیر موالونات و تغییر در مسیرهای متابولیک و سیگنالینگ سلولی مرتبط است. سیمواستاتین با مهار HMG-CoA reductase، تولید FPP و GGPP را کاهش داده و در نتیجه پرنیلاسیون پروتئین‌هایی مانند Ras و RhoA و سیگنال‌های وابسته به آن‌ها را مختل می‌کند (۸۴).

این تغییرات می‌توانند با فعال‌شدن کاسپازهای ۳، ۷، ۸ و ۹ و تغییر در بیان Bax، BCL-2 و BCL-xl همراه باشند (۸۵). همچنین مهار مسیرهای PI3K/Akt، MAPK و mTOR در اثرات ضدتکثیری و آپوپتوتیک سیمواستاتین نقش دارد (۸۲، ۸۶). در مطالعه حاضر، کاهش IC50 سیمواستاتین و افزایش آپوپتوز در سلول‌های HeLa با نقش بالقوه این مسیرها در اثر سایتوتوکسیک دارو سازگار بود.

آتورواستاتین نیز موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های HeLa و CaSki شد و افزایش آپوپتوز در HeLa نشان داد که اثر آن تنها به مهار رشد سلولی محدود نیست. آتورواستاتین با مهار HMG-CoA reductase، تولید FPP و GGPP و پرنیلاسیون GTPase‌هایی مانند Ras و Rho را کاهش می‌دهد و از این طریق می‌تواند مسیرهای رشد و بقا را مهار کند (۸۴). ژانگ و همکاران گزارش کردند که آتورواستاتین از طریق مهار محور mevalonate-YAP، افزایش ROS، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و فعال‌سازی مسیر Caspase-9/Caspase-3/PARP موجب القای آپوپتوز می‌شود (۸۷). همچنین مهار PI3K/Akt در سلول‌های HeLa و CaSki با کاهش BCL-2 و Mcl-1، افزایش Bax و فعال‌شدن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ همراه بوده است (۸۸). مهار PI3K/Akt/mTOR نیز می‌تواند کاهش رشد و افزایش آپوپتوز را تقویت کند (۸۶). بنابراین، اثر آتورواستاتین در مطالعه حاضر می‌تواند با تأثیر هم‌زمان بر مسیر موالونات و مسیرهای بقایی مانند PI3K/Akt/mTOR و YAP مرتبط باشد.

یکی از یافته‌های مهم مطالعه حاضر، افزایش اثرات ضدسرطانی در درمان‌های ترکیبی بود. ترکیب ایرینوتکان با سیمواستاتین در مقایسه با ایرینوتکان منفرد موجب افزایش مرگ سلولی شد و در CaSki، CI برابر با ۰,۰۷ نشان‌دهنده سینرژیسم بسیار قوی بود؛ زیرا مقادیر CI کمتر از یک بیانگر اثر هم‌افزا هستند (۸۹). این اثر می‌تواند ناشی از مکمل‌بودن مکانیسم‌های دو دارو باشد؛ به‌طوری‌که ایرینوتکان با ایجاد آسیب DNA فشار ژنوتوکسیک ایجاد می‌کند، درحالی‌که سیمواستاتین با مهار مسیر موالونات، کاهش ایزوپرنوئیدها و اختلال در پرنیلاسیون پروتئین‌های مرتبط با بقا، ظرفیت سلول برای مقابله با این آسیب را کاهش می‌دهد (۹۰). این اثر هم‌افزا در ترکیب ایرینوتکان با آتورواستاتین نیز مشاهده شد و این ترکیب یکی از قوی‌ترین پاسخ‌های ضدسرطانی مطالعه را ایجاد کرد؛ به‌طوری‌که آپوپتوز کل در سلول‌های HeLa به ۷۲,۲۵٪ رسید. ایرینوتکان با مهار توپوایزومراز I و فعال کردن پاسخ آسیب DNA، سلول را در معرض فشار ژنوتوکسیک قرار می‌دهد (۹۱). درحالی‌که آتورواستاتین از طریق مهار مسیر موالونات و محور YAP، افزایش ROS و اختلال عملکرد میتوکندری می‌تواند ظرفیت سلول برای تحمل این آسیب را کاهش دهد (۸۷). همچنین مسیر موالونات در حفظ عملکرد میتوکندری، سنتز پیریمیدین و بقای سلول‌های سرطانی تحت استرس نقش دارد و مهار آن می‌تواند توانایی سلول برای بازیابی پس از آسیب DNA را محدود کند (۹۲). گزارش شده است که ترکیب عوامل هدف‌گیرنده توپوایزومراز I با مهارکننده‌های مسیرهای بقا نیز می‌تواند آپوپتوز را به‌صورت سینرژیک افزایش دهد. (۹۳). بنابراین، سینرژی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر احتمالاً حاصل هم‌زمانی آسیب DNA و تضعیف مسیرهای متابولیک و بقایی است.

ترکیبات حاوی سیس‌پلاتین نیز اثر هم‌افزای قابل توجهی نشان دادند. ترکیب سیس‌پلاتین با سیمواستاتین موجب افزایش مرگ سلولی شد و در CaSki، CI برابر با ۰,۰۵ در ترکیب IC50+IC50 نشان‌دهنده سینرژی بسیار قوی بود. سیس‌پلاتین از طریق ایجاد اتصالات عرضی DNA و فعال کردن پاسخ آسیب ژنومی، در صورت ناکافی‌بودن ترمیم، مسیرهای مرگ سلولی را فعال می‌کند (۹۴). سیمواستاتین نیز با کاهش FPP و GGPP، مهار پرنیلاسیون Ras و RhoA و تضعیف مسیرهای بقایی می‌تواند این پاسخ را

تقویت کند (۹۳). تغییر در بیان Bax، BCL-2 و BCL-xl و فعال شدن کاسپازهای مختلف نیز در اثرات آپوپتوتیک سیمواستاتین گزارش شده است (۸۵). افزون بر این، مهار PI3K/Akt همراه با فعال شدن AMPK/p53 می‌تواند زنده‌مانی سلولی را کاهش داده و آپوپتوز را افزایش دهد (۹۵).

در میان ترکیبات بررسی‌شده، سیس‌پلاتین همراه با آتورواستاتین قوی‌ترین اثر ضدسرطانی را نشان داد. آپوپتوز کل در HeLa به ۷۳٫۸۴٪ رسید و در CaSki، ترکیب IC50+IC50 با زنده‌مانی ۱۴٪ و CI برابر با ۰٫۰۳، سینرژیسیم بسیار شدیدی ایجاد کرد. این یافته با مطالعات پیشین درباره اثر ضدتوموری سینرژیک استاتین‌ها و سیس‌پلاتین همخوانی دارد (۹۱). از نظر مکانیسمی، سیس‌پلاتین فشار ژنوتوکسیک اولیه را ایجاد می‌کند، درحالی‌که آتورواستاتین با مهار محور mevalonate-YAP، افزایش ROS و اختلال در عملکرد میتوکندری می‌تواند حساسیت سلول به آسیب را افزایش دهد (۸۷). استاتین‌ها همچنین با کاهش کوآنزیم Q و اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌توانند استرس اکسیداتیو را افزایش دهند (۹۶). از سوی دیگر، فعال شدن PI3K/Akt با مقاومت سلول‌های سرطان دهانه رحم به سیس‌پلاتین ارتباط دارد و مهار این مسیر با افزایش آپوپتوز همراه است (۹۷). مطالعات پیشین نیز اثر ضدتوموری سینرژیک ترکیب استاتین‌ها با سیس‌پلاتین را گزارش کرده‌اند (۹۸). در مجموع، این شواهد می‌توانند توضیحی برای قدرت بالای ترکیب سیس‌پلاتین-آتورواستاتین در مطالعه حاضر ارائه دهند؛ هرچند برای اثبات مستقیم این مکانیسم‌ها، بررسی اختصاصی این مسیرها در مطالعات آینده ضروری است.

(۹۱)، (۹۴)، (۸۰)، (۸۴)، (۸۷)، (۸۱)، (۸۴). در بررسی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی و آپوپتوز، تیمارهای ترکیبی در برخی شرایط با افزایش P27 و Caspase-3 و کاهش نسبی BCL-2 همراه بودند. P27 از طریق مهار کمپلکس‌های Cyclin/CDK می‌تواند پیشروی چرخه سلولی را محدود کند و مهار PI3K/Akt نیز با تجمع P27 و توقف چرخه سلولی ارتباط دارد (۹۹). در مورد ترکیبات حاوی ایرینوتکان، آسیب DNA ناشی از مهار توپوایزومراز I می‌تواند با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز همراه باشد. همچنین در مطالعات پیشین، تغییر در Bax، BCL-2 و BCL-xl و فعال شدن کاسپازهای

مختلف در اثر سیمواستاتین گزارش شده است (۸۵). کاهش BCL-2 همراه با افزایش cleaved caspase-3 نیز نشانه فعال شدن آپوپتوز میتوکندریایی در سلول‌های HeLa و CaSki است (۱۰۰). (۸۱) (۸۷) در مورد آتورواستاتین، مهار محور mevalonate-YAP و PI3K/Akt می‌تواند افزایش P27 و کاهش سیگنال‌های بقایی را توضیح دهد (۹۹). کاهش p-Akt، p-ERK، BCL-2 و Survivin پس از استفاده از آتورواستاتین همراه با عوامل حساس‌کننده دارویی نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۰۱). در مطالعات دیگر نیز کاهش BCL-2 و افزایش cleaved caspase-3 در سلول‌های HeLa و CaSki با افزایش آپوپتوز همراه بوده است (۱۰۰). از این رو، یافته‌های بیان ژنی مطالعه حاضر، به‌ویژه در ترکیب‌های دارای آتورواستاتین، می‌تواند با اثر هم‌زمان بر چرخه سلولی، مسیرهای بقا و آپوپتوز سازگار باشد.

در مورد سیس‌پلاتین نیز افزایش نسبت Bax/BCL-2، آزادسازی cytochrome c و افزایش cleaved caspase-9، cleaved caspase-3 و PARP با افزایش حساسیت سلول‌های سرطان دهانه رحم همراه بوده است (۱۰۲). بنابراین، الگوی بیان ژن مشاهده‌شده در مطالعه حاضر با مشارکت هم‌زمان مسیرهای کنترل چرخه سلولی و آپوپتوز در اثرات ترکیبی سازگار است.

(۸۵). (۱۰۳). (۹۹).

(۱۰۴). (۱۰۴). (۱۰۵). (۹۸). (۱۰۶). (۸۱). (۹۰). (۸۵). (۹۵).

با این حال، افزایش غیرمنتظره BCL-2 در برخی گروه‌های تیماری نیازمند تفسیر محتاطانه است. افزایش BCL-2 می‌تواند بخشی از پاسخ تطابقی سلول به استرس دارویی باشد؛ در سلول‌های HeLa و CaSki نیز افزایش بیان BCL-2 پس از مواجهه با سیس‌پلاتین گزارش شده است (۱۰۷). از سوی دیگر، سرنوشت سلول تنها به میزان BCL-2 وابسته نیست و تعادل عملکردی میان اعضای پروآپوپتوتیک و ضدآپوپتوتیک خانواده BCL-2، از جمله BAX و BAK، اهمیت دارد (۱۰۸). همچنین، از آنجا که در مطالعه حاضر بیان ژن در سطح mRNA با qPCR ارزیابی شده است، تغییر در سطح رونوشت الزاماً معادل تغییر در مقدار یا

عملکرد پروتئین نیست و تنظیم ترجمه، تخریب پروتئین و اصلاحات پساز ترجمه ای می‌توانند در این اختلاف نقش داشته باشند (۱۰۹). بنابراین، افزایش BCL-2 در برخی گروه‌ها لزوماً با کاهش آپوپتوز تناقض ندارد و برای تفسیر قطعی آن، بررسی هم‌زمان سطح پروتئین و شکل فعال پروتئین‌های مرتبط با مسیر آپوپتوز ضروری است. همچنین گزارش شده است که BCL-2 می‌تواند تحت شرایط خاص و در اثر برش کاسپازی تغییر عملکرد دهد (۱۱۰).

۵-۲: محدودیت های مطالعه :

یکی از مهم ترین محدودیت های پژوهش حاضر، آزمایشگاهی بودن مطالعه و استفاده از رده های سلولی بود؛ بنابراین نتایج به دست آمده مستقیماً قابل تعمیم به شرایط بالینی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم نیست. اگرچه رده های HeLa و CaSki مدل های پرکاربردی برای بررسی پاسخ سلول های سرطانی هستند، اما رفتار آنها ممکن است با تومور واقعی در بدن انسان متفاوت باشد. همچنین، ارزیابی سمیت سلولی عمدتاً بر اساس آزمون MTT انجام شد که بیشتر نشان دهنده تغییرات زنده ماندن و فعالیت متابولیک سلول هاست و به تنهایی نوع دقیق مرگ سلولی را مشخص نمی کند. هرچند فلوسایتومتری برای بررسی آپوپتوز استفاده شد، اما بررسی مسیرهای مولکولی در سطح پروتئین، مانند Western blot یا سنجش فعالیت کاسپازها، انجام نشده است. محدودیت دیگر، تمرکز بر تعداد محدودی از ژن های مرتبط با آپوپتوز و چرخه سلولی بود و سایر مسیرهای احتمالی مؤثر در پاسخ دارویی بررسی نشدند. علاوه بر این، اثر ترکیبات دارویی تنها در بازه های زمانی مشخص و با غلظت های منتخب بررسی شد. نبود مدل حیوانی، عدم بررسی دقیق مهاجرت و تهاجم سلولی، و محدود بودن ارزیابی سمیت روی سلول های طبیعی نیز از دیگر محدودیت های این پژوهش محسوب می شود.

۵-۳: نتیجه گیری:

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آتورواستاتین، سیمواستاتین، سیسپلاتین و ایرینوتکان می‌توانند زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی دهانه رحم را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهند. کاهش مقدار IC_{50} در زمان ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که افزایش مدت مواجهه با داروها موجب افزایش اثر مهارى آن‌ها بر رشد سلولى شده است. همچنین، بررسی ترکیبات دارویی نشان داد که بسیاری از ترکیب‌های دو دارویی، به‌ویژه ترکیبات حاوی آتورواستاتین، اثر هم‌افزایی قابل توجهی بر سلول‌های HeLa و CaSki داشتند. نتایج فلوسایتومتری نیز نشان داد که ترکیبات دارویی نسبت به درمان‌های منفرد توانایی بیشتری در القای آپوپتوز دارند؛ به‌ویژه ترکیب ایرینوتکان + آتورواستاتین و سیسپلاتین + آتورواستاتین در سلول‌های HeLa بیشترین میزان آپوپتوز کل را ایجاد کردند. از نظر بیان ژن، افزایش بیان $CDKN1B/P27$ و $Caspase3$ و کاهش نسبی $BCL2$ در برخی گروه‌های ترکیبی، مؤید فعال شدن مسیرهای مرتبط با توقف چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول است. در مجموع، یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب استاتین‌ها با داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد مکمل بالقوه برای افزایش اثر ضدسرطانی در سرطان دهانه رحم مطرح شود.

۵-۴: پیشنهادات برای پژوهش های بعدی:

با توجه به نتایج این مطالعه، پیشنهاد می شود در پژوهش های آینده اثر ترکیبات دارویی منتخب، به ویژه ایرینوتکان + آتورواستاتین و سیس پلاتین + آتورواستاتین، در مدل های پیشرفته تر بررسی شود. استفاده از مدل های سه بعدی کشت سلولی، ارگانوئیدهای توموری و مدل های حیوانی می تواند اطلاعات دقیق تری درباره پاسخ واقعی تومور به درمان ترکیبی ارائه دهد. پیشنهاد می شود علاوه بر بررسی بیان ژن، سطح پروتئین های مرتبط با آپوپتوز و چرخه سلولی مانند Bax، BCL2، P27، P53 و Caspase3 نیز با روش هایی مانند Western blot یا ELISA بررسی شود. در نهایت، انجام مطالعات بالینی پس از تأیید نتایج آزمایشگاهی و حیوانی می تواند مسیر استفاده درمانی از این ترکیبات را روشن تر کند.

۵-۵: ترجمان دانش

نتایج این مطالعه می‌تواند زمینه‌ای برای بررسی استفاده از استاتین‌ها به عنوان داروهای کمکی در درمان سرطان دهانه رحم فراهم کند. اثر هم‌افزای مشاهده‌شده، به‌ویژه در ترکیب آتورواستاتین با سیس‌پلاتین و ایرینوتکان، این احتمال را مطرح می‌کند که افزودن استاتین‌ها بتواند حساسیت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی‌درمانی را افزایش دهد و در آینده به کاهش دوز داروهای شیمی‌درمانی یا بهبود پاسخ درمانی کمک کند. با این حال، چنین کاربردهایی در حال حاضر صرفاً یک فرضیه مبتنی بر یافته‌های آزمایشگاهی هستند و پیش از هرگونه توصیه بالینی، نیازمند تأیید در مطالعات حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی هستند.

منابع

1. Sharma S, Deep A, Sharma AK. Current treatment for cervical cancer: an update. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2020;20(15):1768-79
2. Martinez-Rodriguez F, Limones-González JE, Mendoza-Almanza B, Esparza-Ibarra EL, Gallegos-Flores PI, Ayala-Luján JL, et al. Understanding cervical cancer through proteomics. *Cells*. 2021;10(8):1854
3. Luo W. Predicting cervical cancer outcomes: statistics, images, and machine learning. *Frontiers in Artificial Intelligence*. 2021;4:627369
4. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health*. 2020;8(2):e191-e203
5. Huo Z, Liu K, Zhang X, Liang Y, Sun X. Discovery of pyrimidine-bridged CA-4 CBSIs for the treatment of cervical cancer in combination with cisplatin with significantly reduced nephrotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;235:114271
6. Irvin WP, Price FV, Bailey H, Gelder M, Rosenbluth R, Durivage HJ, et al. A phase II study of irinotecan (CPT- 11) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1998;82(2):328-33
7. Sawaya GF, Smith-McCune K, Kuppermann M. Cervical cancer screening: more choices in 2019. *Jama*. 2019;321(20):2018-9
8. Burmeister CA, Khan SF, Schäfer G, Mbatani N, Adams T, Moodley J, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour virus research*. 2022;13:200238
9. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M, editors. *Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management*. Seminars in oncology nursing; 2019: Elsevier.
10. Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, Tomara E, Iatrakis G, Romanidis C, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. *J buon*. 2016;21(2):320-5
11. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*. 2019;88:102925
12. Collaboration CfCCM-A. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]*. 2008
13. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin- induced DNA damage. *Journal of nucleic acids*. 2010;2010(1):201367
14. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*. 2014;740:364-78
15. de Man FM, Goey AK, van Schaik RH, Mathijssen RH, Bins S. Individualization of irinotecan treatment: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics. *Clinical pharmacokinetics*. 2018;57(10):1229-54

16. Shaghghi Z, Alvandi M, Farzipour S, Dehbanpour MR, Nosrati S. A review of effects of atorvastatin in cancer therapy. *Medical Oncology*. 2022;40(1):27
17. Sarbassova G, Nurlan N, Francis N, Alshammari M, Aljofan M. Investigating potential anti-proliferative activity of different statins against five cancer cell lines. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(5):727-35
18. Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, et al. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacological reviews*. 2012;64(1):102-46
19. Pimple SA, Mishra GA. Global strategies for cervical cancer prevention and screening. *Minerva Ginecol*. 2019;71(4):313-20
20. Farghaly H, Bourgeois D, Houser PM, Padmanabhan V, Lage JM, Hoda RS. Routine vaginal Pap test is not useful in women status-post hysterectomy for benign disease. *Diagn Cytopathol*. 2006;34(9):640-3
21. Pierre-Victor D, Stephens DP, Omondi A, Clarke R, Jean-Baptiste N, Madhivanan P. Barriers to HPV Vaccination Among Unvaccinated, Haitian American College Women. *Health Equity*. 2018;2(1):90-7
22. Manini I, Montomoli E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig*. 2018;30(4 Suppl 1):28-32
23. Rauh-Hain JA, Melamed A, Schaps D, Bregar AJ, Spencer R, Schorge JO, et al. Racial and ethnic disparities over time in the treatment and mortality of women with gynecological malignancies. *Gynecol Oncol*. 2018;149(1):4-11
24. Choi PW, Liu TL, Wong CW, Liu SK, Lum YL, Ming WK. The Dysregulation of MicroRNAs in the Development of Cervical Pre-Cancer-An Update. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13)
25. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat*. 2011;20(3):125-33
26. Hutchcraft ML, Miller RW. Bleeding from Gynecologic Malignancies. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2022;49(3):607-22
27. Mirpour S, Mhlanga JC, Logeswaran P, Russo G, Mercier G, Subramaniam RM. The role of PET/CT in the management of cervical cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2013;201(2):W192-205
28. Senol T, Polat M, Ozkaya E, Karateke A. Comparison of Two Step LEEP and Cold Conisation For Cervical Intraepithelial Lesions to Decrease Positive Surgical Margins. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3317-20
29. Larsson G, Gullberg B, Grundsell H. A comparison of complications of laser and cold knife conization. *Obstet Gynecol*. 1983;62(2):213-7
30. Querleu D, Morrow CP. Classification of radical hysterectomy. *Lancet Oncol*. 2008;9(3):297-303
31. Mathevet P, Lécuru F, Uzan C, Boutitie F, Magaud L, Guyon F, et al. Sentinel lymph node biopsy and morbidity outcomes in early cervical cancer: Results of a multicentre randomised trial (SENTICOL-2). *Eur J Cancer*. 2021;148:307-15
32. Bizzarri N, Chiantera V, Ercoli A, Fagotti A, Tortorella L, Conte C, et al. Minimally Invasive Pelvic Exenteration for Gynecologic Malignancies: A Multi-Institutional Case Series and Review of the Literature. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019;26(7):1316-26
33. Magrina JF, Stanhope CR, Weaver AL. Pelvic exenterations: supralelevator, infralevator, and with vulvectomy. *Gynecol Oncol*. 1997;64(1):130-5
34. Alouini S, Rida K, Mathevet P. Cervical cancer complicating pregnancy: implications of laparoscopic lymphadenectomy. *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):472-7

35. Amant F, Berveiller P, Boere IA, Cardonick E, Fruscio R, Fumagalli M, et al. Gynecologic cancers in pregnancy: guidelines based on a third international consensus meeting. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1601-12
36. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999;340(15):1137-43
37. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol.* 2000;18(8):1606-13
38. Gonzalez VJ, Hullett CR, Burt L, Rassiah-Szegedi P, Sarkar V, Tward JD, et al. Impact of prone versus supine positioning on small bowel dose with pelvic intensity modulated radiation therapy. *Adv Radiat Oncol.* 2017;2(2):235-43
39. Kavanagh BD, Pan CC, Dawson LA, Das SK, Li XA, Ten Haken RK, et al. Radiation dose-volume effects in the stomach and small bowel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3 Suppl):S101-7
40. Viswanathan AN, Beriwal S, De Los Santos JF, Demanes DJ, Gaffney D, Hansen J, et al. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part II: high-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy.* 2012;11(1):47-52
41. Dimopoulos JC, Petrow P, Tanderup K, Petric P, Berger D, Kirisits C, et al. Recommendations from Gynaecological (GYN) GEC-ESTRO Working Group (IV): Basic principles and parameters for MR imaging within the frame of image based adaptive cervix cancer brachytherapy. *Radiother Oncol.* 2012;103(1):113-22
42. Liu R, Wang X, Tian JH, Yang K, Wang J, Jiang L, et al. High dose rate versus low dose rate intracavity brachytherapy for locally advanced uterine cervix cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(10):CD007563
43. Mazon R, Fokdal LU, Kirchheiner K, Georg P, Jastaniyah N, Šegedin B, et al. Dose-volume effect relationships for late rectal morbidity in patients treated with chemoradiation and MRI-guided adaptive brachytherapy for locally advanced cervical cancer: Results from the prospective multicenter EMBRACE study. *Radiother Oncol.* 2016;120(3):412-9
44. Wright JD, St Clair CM, Deutsch I, Burke WM, Gorrochurn P, Sun X, et al. Pelvic radiotherapy and the risk of secondary leukemia and multiple myeloma. *Cancer.* 2010;116(10):2486-92
45. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999;340(15):1144-53
46. Colombo N, Dubot C, Lorusso D, Caceres MV, Hasegawa K, Shapira-Frommer R, et al. Pembrolizumab for Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2021;385(20):1856-67
47. Salib MY, Russell JHB, Stewart VR, Sudderuddin SA, Barwick TD, Rockall AG, et al. 2018 FIGO Staging Classification for Cervical Cancer: Added Benefits of Imaging. *Radiographics.* 2020;40(6):1807-22
48. Rauh-Hain JA, Clemmer JT, Bradford LS, Clark RM, Growdon WB, Goodman A, et al. Racial disparities in cervical cancer survival over time. *Cancer.* 2013;119(20):3644-52
49. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with

- optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2003;21(17):3194-200
50. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, Malfetano JH, Hannigan EV, Fowler WC, et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1339-48
51. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1145-53
52. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol.* 2008;26(7):1086-92
53. Wozniak AJ, Crowley JJ, Balcerzak SP, Weiss GR, Spiridonidis CH, Baker LH, et al. Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1998;16(7):2459-65
54. Fornasiero A, Daniele O, Ghiotto C, Piazza M, Fiore-Donati L, Calabró F, et al. Chemotherapy for invasive thymoma. A 13-year experience. *Cancer.* 1991;68(1):30-3
55. Cushing B, Giller R, Cullen JW, Marina NM, Lauer SJ, Olson TA, et al. Children's Cancer Group 8882. Randomized comparison of combination chemotherapy with etoposide, bleomycin, and either high-dose or standard-dose cisplatin in children and adolescents with high-risk malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study--Pediatric Oncology Group 9049 and Children's Cancer Group 8882. *J Clin Oncol.* 2004;22(13):2691-700
56. Douglass EC, Reynolds M, Finegold M, Cantor AB, Glicksman A. Cisplatin, vincristine, and fluorouracil therapy for hepatoblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1993;11(1):96-9
57. Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci.* 2018;18
58. Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(7):1053-73
59. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs.* 2000;59 Suppl 4:19-27
60. O'Malley PG, Arnold MJ, Kelley C, Spacek L, Buelt A, Natarajan S, et al. Management of Dyslipidemia for Cardiovascular Disease Risk Reduction: Synopsis of the 2020 Updated U.S. Department of Veterans Affairs and U.S. Department of Defense Clinical Practice Guideline. *Ann Intern Med.* 2020;173(10):822-9
61. Strilchuk L, Tocci G, Fogacci F, Cicero AFG. An overview of rosuvastatin/ezetimibe association for the treatment of hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(5):531-9
62. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 2014;88:3-11
63. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(5):554-62
64. Climent E, Benaiges D, Pedro-Botet J. Hydrophilic or Lipophilic Statins. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:687585
65. Filppula AM, Hirvensalo P, Parviainen H, Ivaska VE, Lönnberg KI, Deng F, et al. Comparative Hepatic and Intestinal Metabolism and Pharmacodynamics of Statins. *Drug Metab Dispos.* 2021;49(8):658-67

66. Egom EE, Hafeez H. Biochemistry of Statins. *Adv Clin Chem*. 2016;73:127-68
67. Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(25):2495-502
68. Wiggins BS, Saseen JJ, Page RL, Reed BN, Sneed K, Kostis JB, et al. Recommendations for Management of Clinically Significant Drug-Drug Interactions With Statins and Select Agents Used in Patients With Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134(21):e468-e95
69. Fujita K, Kubota Y, Ishida H, Sasaki Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12234-48
70. de Man FM, Goey AKL, van Schaik RHN, Mathijssen RHJ, Bins S. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(10):1229-54
71. Di Paolo A, Bocci G, Danesi R, Del Tacca M. Clinical pharmacokinetics of irinotecan-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Curr Clin Pharmacol*. 2006;1(3):311-23
72. Robert J, Rivory L. Pharmacology of irinotecan. *Drugs Today (Barc)*. 1998;34(9):777-803
73. Abang AM. The clinical pharmacology of topoisomerase I inhibitors. *Semin Hematol*. 1998;35(3 Suppl 4):13-21
74. Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2010;11(7):1003-10
75. Ying X, Li-Zhi L, Li-Ping C, Min Z, Ji-Hong L. Clinical effects of irinotecan hydrochloride in combination with cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2011;123(1):99-104
76. Han JY, Lim KY, Yu SY, Yun T, Kim HT, Lee JS. A phase 2 study of irinotecan, cisplatin, and simvastatin for untreated extensive-disease small cell lung cancer. *Cancer*. 2011;117(10):2178-85
77. Bhat A, Verma S, Chander G, Jamwal RS, Sharma B, Bhat A. Cisplatin-based combination therapy for cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2023
78. Zhou Q, Jiao Z, Liu Y, Devreotes PN, Zhang Z. The effects of statins in patients with advanced-stage cancers-a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Oncology*. 2023;13
79. Lee Y, Lee SH, Lee GK, Lim EJ, Han JY. A Randomized Phase II Study of Irinotecan Plus Cisplatin with or without Simvastatin in Ever-Smokers with Extended Disease Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*. 2023;55(3):885
80. Bao X, Wu J, Kim S, LoRusso P, Li J. Pharmacometabolomics reveals irinotecan mechanism of action in cancer patients. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2019;59(1):20-34
81. Shin WS, Han J, Kumar R, Lee GG, Sessler JL, Kim J-H, et al. Programmed activation of cancer cell apoptosis: A tumor-targeted phototherapeutic topoisomerase I inhibitor. *Scientific reports*. 2016;6(1):29018
82. Potikanond S, Sookkhee S, Na Takuathung M, Mungkornasawakul P, Wikan N, Smith DR, et al. Kaempferia parviflora extract exhibits anti-cancer activity against HeLa cervical cancer cells. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:630
83. Souza RP, Bonfim-Mendonca PdS, Gimenes F, Ratti BA, Kaplum V, Bruschi ML, et al. Oxidative stress triggered by apigenin induces apoptosis in a comprehensive panel of human cervical cancer- derived cell lines. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017(1):1512745

84. Pan Q, Xu J, Ma L. Simvastatin enhances chemotherapy in cervical cancer via inhibition of multiple prenylation- dependent GTP ases- regulated pathways. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2020;34(1):32-40
85. Sheikholeslami K, Ali Sher A, Lockman S, Kroft D, Ganjibakhsh M, Nejati-Koshki K, et al. Simvastatin induces apoptosis in medulloblastoma brain tumor cells via mevalonate cascade prenylation substrates. *Cancers*. 2019;11(7):994
86. Jia L, Hu Y, Yang G, Li P. Puerarin suppresses cell growth and migration in HPV-positive cervical cancer cells by inhibiting the PI3K/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019;18(1):543-9
87. Zhang L, Chen T, Dou Y, Zhang S, Liu H, Khishignyam T, et al. Atorvastatin exerts antileukemia activity via inhibiting mevalonate-YAP axis in K562 and HL60 cells. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1032
88. Luo L, Zhu S, Tong Y, Peng S. Ferulic acid induces apoptosis of HeLa and Caski cervical carcinoma cells by down-regulating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2020;26:e920095-1
89. Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across disciplines. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:158
90. Alizadeh J, Zeki AA, Mirzaei N, Tewary S, Rezaei Moghadam A, Glogowska A, et al. Mevalonate cascade inhibition by simvastatin induces the intrinsic apoptosis pathway via depletion of isoprenoids in tumor cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):44841
91. Reuvers T, Kanaar R, Nonnekens J. DNA Damage-Inducing Anticancer Therapies: From Global to Precision Damage. *Cancers*, 12 (8), 2098. 2020
92. Kaymak I, Maier CR, Schmitz W, Campbell AD, Dankworth B, Ade CP, et al. Mevalonate pathway provides ubiquinone to maintain pyrimidine synthesis and survival in p53-deficient cancer cells exposed to metabolic stress. *Cancer Research*. 2020;80(2):189-203
93. Ki DH, Oppel F, Durbin AD, Look AT. Mechanisms underlying synergy between DNA topoisomerase I-targeted drugs and mTOR kinase inhibitors in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncogene*. 2019;38(39):6585-98
94. Chang W-C, Hsieh C-H, Hsiao M-W, Lin W-C, Hung Y-C, Ye J-C. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2010;49(4):419-24
95. Chen Y-H, Yang S-F, Yang C-K, Tsai H-D, Chen T-H, Chou M-C, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. *Molecular medicine reports*. 2021;23(1):88
96. McGregor GH, Campbell AD, Fey SK, Tumanov S, Sumpton D, Blanco GR, et al. Targeting the metabolic response to statin-mediated oxidative stress produces a synergistic antitumor response. *Cancer research*. 2020;80(2):175-88
97. Wang N, Hou M, Zhan Y, Shen X, Xue H. MALAT1 promotes cisplatin resistance in cervical cancer by activating the PI3K/AKT pathway. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2018;22(22)
98. Kwon M, Nam G-H, Jung H, Kim SA, Kim S, Choi Y, et al. Statin in combination with cisplatin makes favorable tumor-immune microenvironment for immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*. 2021;522:198-210

99. Prasad SB, Yadav SS, Das M, Modi A, Kumari S, Pandey LK, et al. PI3K/AKT pathway-mediated regulation of p27Kip1 is associated with cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer. *Cellular oncology*. 2015;38(3):215-25
100. Yan L, Huang H, Zhang Y, Yuan X, Yan Z, Cao C, et al. Involvement of p53-dependent apoptosis signal in antitumor effect of Colchicine on human papilloma virus (HPV)-positive human cervical cancer cells. *Bioscience reports*. 2020;40(3):BSR20194065
101. Wang Z, Zhang L, Wan Z, He Y, Huang H, Xiang H, et al. Atorvastatin and Caffeine in Combination Regulates Apoptosis, Migration, Invasion and Tumorspheres of Prostate Cancer Cells. *Pathology & Oncology Research*. 2020;26(1)
102. Hu G, Zhang J, Xu F, Deng H, Zhang W, Kang S, et al. Stomatin- like protein 2 inhibits cisplatin- induced apoptosis through MEK/ERK signaling and the mitochondrial apoptosis pathway in cervical cancer cells. *Cancer Science*. 2018;109(5):1357-68
103. Liu H, Lee G, Lee JI, Ahn T-G, Kim SA. Effects of genistein on anti-tumor activity of cisplatin in human cervical cancer cell lines. *Obstetrics & Gynecology Science*. 2019;62(5):322
104. Dong Y, Quan H-Y. Downregulated LINC00460 inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in prostate cancer. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2019;23(14)
105. Aktepe OH, Şahin TK, Güner G, Arik Z, Yalçın Ş. Lycopene sensitizes the cervical cancer cells to cisplatin via targeting nuclear factor-kappaB (NF- B) pathway. *Turkish journal of medical sciences*. 2021;51(1):368-74
106. Lee H, Lee D, Kang KS, Song JH, Choi Y-K. Inhibition of intracellular ROS accumulation by formononetin attenuates cisplatin-mediated apoptosis in LLC-PK1 cells. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3):813
107. Leisching G, Loos B, Botha M, Engelbrecht AM. Bcl-2 confers survival in cisplatin treated cervical cancer cells: circumventing cisplatin dose-dependent toxicity and resistance. 2015
108. Certo M, Moore VDG, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell*. 2006;9(5):351-65
109. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*. 2012;13(4):227-32
110. Cheng EH-Y, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 1997;278(5345):1966-8

Investigating the Synergistic Effects of Cisplatin and Irinotecan in Combination with Simvastatin and Atorvastatin on the induction of Cell Death in Cervical Cancer Cells

Abstract

Background: Cervical cancer is one of the most common malignancies among women and a major cause of cancer-related mortality, particularly in developing countries. Although cisplatin and irinotecan are used in the treatment of some cancers, drug resistance and treatment-related toxicity remain major challenges. Statins, including atorvastatin and simvastatin, in addition to their lipid-lowering effects, have been reported to possess antiproliferative, pro-apoptotic, and anticancer properties. Therefore, evaluating the combined effects of these drugs can be a potential approach to enhancing cell death and improving therapeutic response in cervical cancer.

Aim: To determine the synergistic effects of cisplatin and irinotecan in combination with atorvastatin and simvastatin on cell death, apoptosis, and related genes in cervical cancer cells.

Materials and Methods: This study was conducted in vitro on HeLa and CaSki cell lines as cervical cancer models and the HFFF2 cell line as a normal cell model. Cells were treated with atorvastatin, simvastatin, cisplatin, and irinotecan individually and in combination. Cell viability was measured using the MTT assay, and the IC₅₀ value was calculated. Synergistic or antagonistic effects of the drug combinations were evaluated using the combination index (CI). Apoptosis was examined using Annexin V-FITC/PI flow cytometry, and the expression of CDKN1B/P27, Bcl2, and Caspase3 genes was measured using Real-time PCR.

Results: MTT results showed that all drugs caused a dose- and time-dependent decrease in cell viability. In HeLa cells, the IC₅₀ of atorvastatin decreased from 91.58 µg/mL at 24 hours to 7.56 µg/mL at 48 hours, and the IC₅₀ of simvastatin decreased from 73.82 to 3.17 µg/mL. The strongest synergy in HeLa was observed for irinotecan + atorvastatin with CI=0.44, and in CaSki for atorvastatin + cisplatin with CI=0.03. The combination of irinotecan + atorvastatin and cisplatin + atorvastatin in HeLa created 72.25% and 73.84% total apoptosis, respectively. Changes in apoptosis and changes in the expression of P27, Bcl2, and Caspase3 genes were statistically significant in several treatment groups ($p < 0.001$).

Conclusion: The combination of statins, particularly atorvastatin, with cisplatin or irinotecan increased cytotoxic effects, enhanced apoptosis, and altered the expression of genes related to cell death in cervical cancer cells. These combinations can be proposed as potential complementary options for subsequent preclinical studies.

Keywords: Cervical Cancer, Atorvastatin, Simvastatin, Apoptosis, Cisplatin, Irinotecan



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

Ardabil University of Medical sciences

Faculty of Medicine

A Thesis submitted for Doctorate Degree in Medicine

Investigating the Synergistic Effects of Cisplatin and Irinotecan in Combination with Simvastatin and Atorvastatin on the induction of Cell Death in Cervical Cancer Cells

By: Maral Mahmoudi

Supervisors: Dr. Zahra Ghavami- Dr. Elham Safarzadeh
