

Expression of Noncoding RNA (NF- κ B Interacting) and Its Clinical Outcomes in Breast Cancer Patients Infected with Human Papillomavirus (HPV) Type 16/18

Noor W. Hashim¹, Manar Serhan Ahmed², Ali Yousif Nori³, Hany A. Al-hussaniy^{4,5}✉

¹Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

²Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Al-Farahidi University Baghdad, Iraq

³Department of Pharmacy, AL Mustafa University College, Baghdad, Iraq

⁴Department of Pharmacy, Al-Nisour University College, Baghdad, Iraq

⁵Dr Hany Akeel Institute, Iraqi Medical Research Center, Baghdad, Iraq

Received: 2024/10/09
Accepted: 2025/01/24

*Corresponding Author:
Hany_akeel2000@yahoo.com

Ethics Approval:
142-2017

Abstract

Introduction: To analyze the long-chain non-binding nuclear factor κ B interaction in breast cancer patients infected with human papillomavirus (HPV) type 16/18 and its correlation with the prognosis of breast cancer.

Method Select 400 breast cancer patients (observation group), and 50 benign breast disease patients (control group) admitted to Alkarama and Alyarmook Hospitals from Jan 2017 to January 2022. NKILA expression by using (ELISA and qPCR) and the serum index levels were detected.

Results: The relative expression of NKILA in the tumor tissue of the patients in the observation group was significantly lower than that of the adjacent tissue ($P < 0.05$), and the relative expression of NKILA in the adjoining tissue was considerably lower. Compared with the control group ($P < 0.05$). The relative expression of NKILA and the high expression rate of NKILA in tumor tissues of the HPV 16/18 infection group were significantly lower than those of the non-HPV16/18 infection group. The relative expression of NKILA and the high expression rate of NKILA in tumor tissues in the recurrence and metastasis group were lower than those in the non-recurrence and metastasis group. (all $P < 0.05$)

Conclusion: The expression of NKILA is significantly reduced in breast cancer lesions compared to adjacent tissues and benign lesions. This decrease is more pronounced in patients with HPV 16/18 infection, triple-negative breast cancer, and those who have undergone surgical treatment. Furthermore, NKILA expression is markedly lower in patients with post-recurrence and metastatic breast cancer. These findings suggest that NKILA may serve as a potential biomarker for disease progression and recurrence in HPV-associated breast cancer.

Keywords: Complement Factor B, Human papillomavirus, Control Groups, Triple Negative Breast Neoplasms



Introduction

Breast cancer is the leading cause of cancer-related mortality among women worldwide. HPV types 16 and 18-associated breast cancers exhibit significantly higher recurrence rates and shorter disease-free survival compared to HPV-negative cases [1]. Despite progress in HPV-related cancer research, the role of NKILA, a noncoding RNA that interacts with NF- κ B, remains unexplored in HPV 16/18-associated breast cancers [2].

HPVs are DNA viruses that infect squamous epithelial cells in the skin, vaginal mucosa, and oral cavity. Persistent high-risk infections, particularly HPV 16 and 18, are strongly associated with cervical, anal, and

oropharyngeal cancers, despite most infections being asymptomatic and self-limiting [3]. Globally, HPV-related cervical cancer accounts for approximately 528,000 new cases and 266,000 deaths annually, with 70% of oropharyngeal cancers linked to HPV 16, which is also associated with better survival rates compared to HPV-negative cases [4].

Over 70% of cervical cancers and precancerous lesions are linked to HPV 16 and 18, which are also implicated in breast cancer. Understanding the connection between HPV infection and breast cancer is critical for identifying molecular mechanisms and therapeutic targets. Possible transmission pathways are shown in Figure 1.

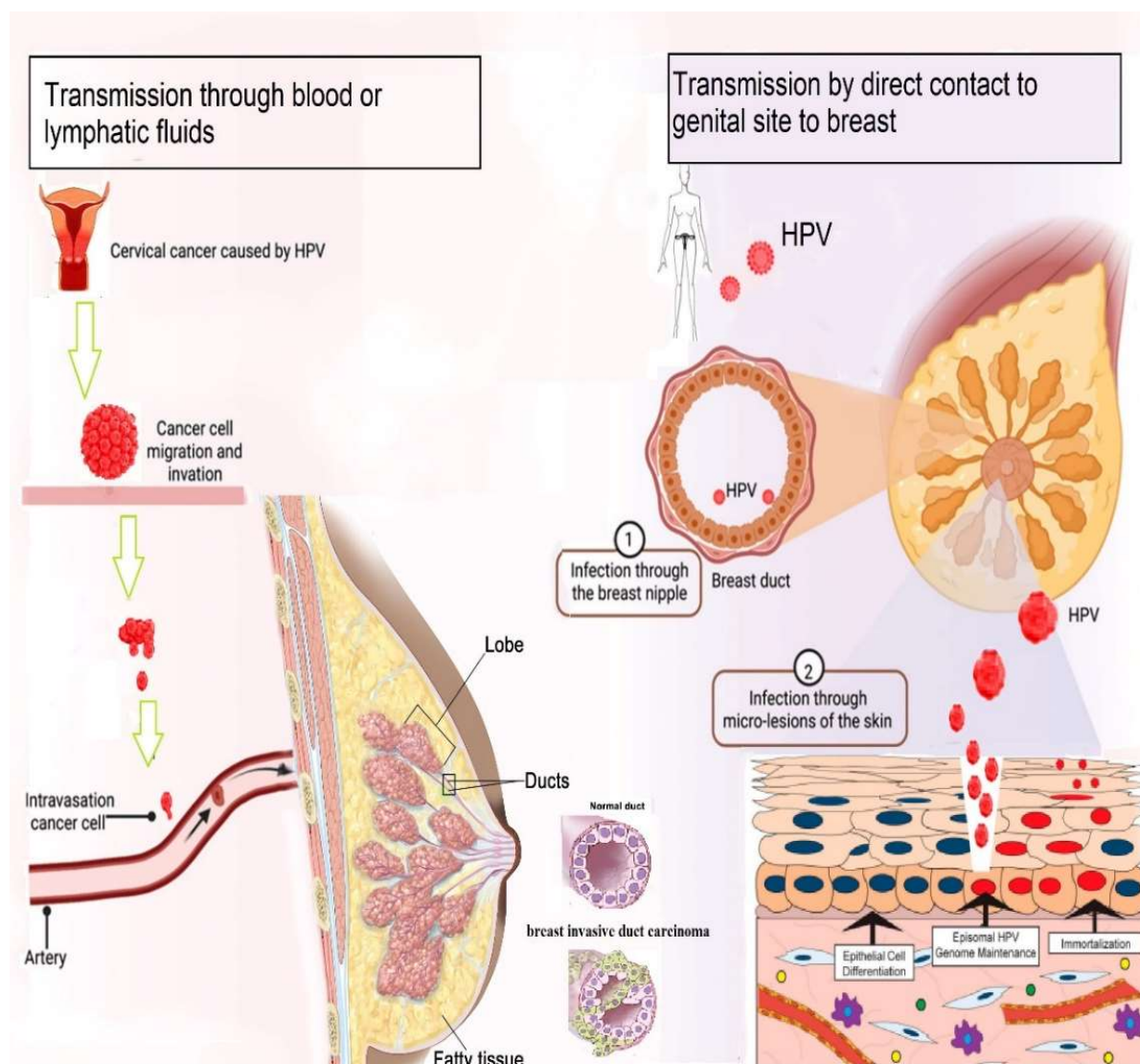


Fig 1: shows the proposed method of transmission of HPV.

Materials and Methods

Detection Methods

- NKILA Expression Detection

During surgery, 30-100 mg of breast tumor, adjacent, and benign tissues were collected. RNA extraction using Thermo NanoDrop ensured purity ($A_{260}/A_{280} = 1.9-2.1$). Reverse transcription and real-time PCR measured NKILA expression, categorized as high (>1.152) or low (≤ 1.152). Select tissues underwent in situ hybridization [5,6].

- HPV Infection Detection

HPV detection used the Luminex 200 chip platform and an HPV typing kit. Patients were grouped as HPV 16/18 infected, non-HPV 16/18 infected, or non-HPV infected.

- Serum Indicators

Fasting venous blood (2 ml) was collected, centrifuged, and analyzed for IL-6, VEGF, and

VEGFR-2 using ELISA kits (Invitrogen Thermo Fisher Scientific).

Analysis Methods

- NKILA Expression Analysis

NKILA expression in tumor tissues was compared between observation and control groups alongside serum biomarkers (IL-6, VEGF, VEGFR-2). Correlations between NKILA and the biomarkers were analyzed.

- Analysis of NKILA Expression and Clinical Features

NKILA expression was analyzed across HPV infection types, molecular subtypes (Luminal A, Luminal B, HER-2 overexpression, and triple-negative), and prognoses. Prognostic data were collected through telephone and outpatient follow-ups for recurrence and metastasis over three years, confirmed via pathology (Table 1).

Table 1: Classification and grouping of the patient according to recurrence and metastasis and according to their expression of NKILA

Groups	Number of patients
recurrence and metastasis group	250
non-recurrence and metastasis group	107
high-expression group NKILA	240
NKILA low-expression group	254

Statistical Methods

Data were analyzed using SPSS 22.0. Categorical variables were assessed with χ^2 tests, continuous variables with t-tests or F tests, and correlations with Pearson analysis. Kaplan-Meier was used for survival analysis, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

NKILA Expression

The relative expression of NKILA in tumor tissues of the observation group was significantly lower than in paracancerous tissues and control group lesion tissues (all $P < 0.05$) (Table 2, Figure 2).

Table 2: Comparison of NKILA expression in lesion tissue between the observation group and the control group ($\bar{x} \pm s$)

NKILA expression	Group
16.95 ± 2.80	Control group (n = 50)
1.36 ± 0.22	Observation group (n = 400)
P value < 0.001	

Note: Compared with tumor tissue, a $P < 0.05$; compared with adjacent tissue, b $P < 0.05$. NKILA is a long noncoding RNA that interacts with nuclear factor κ B.

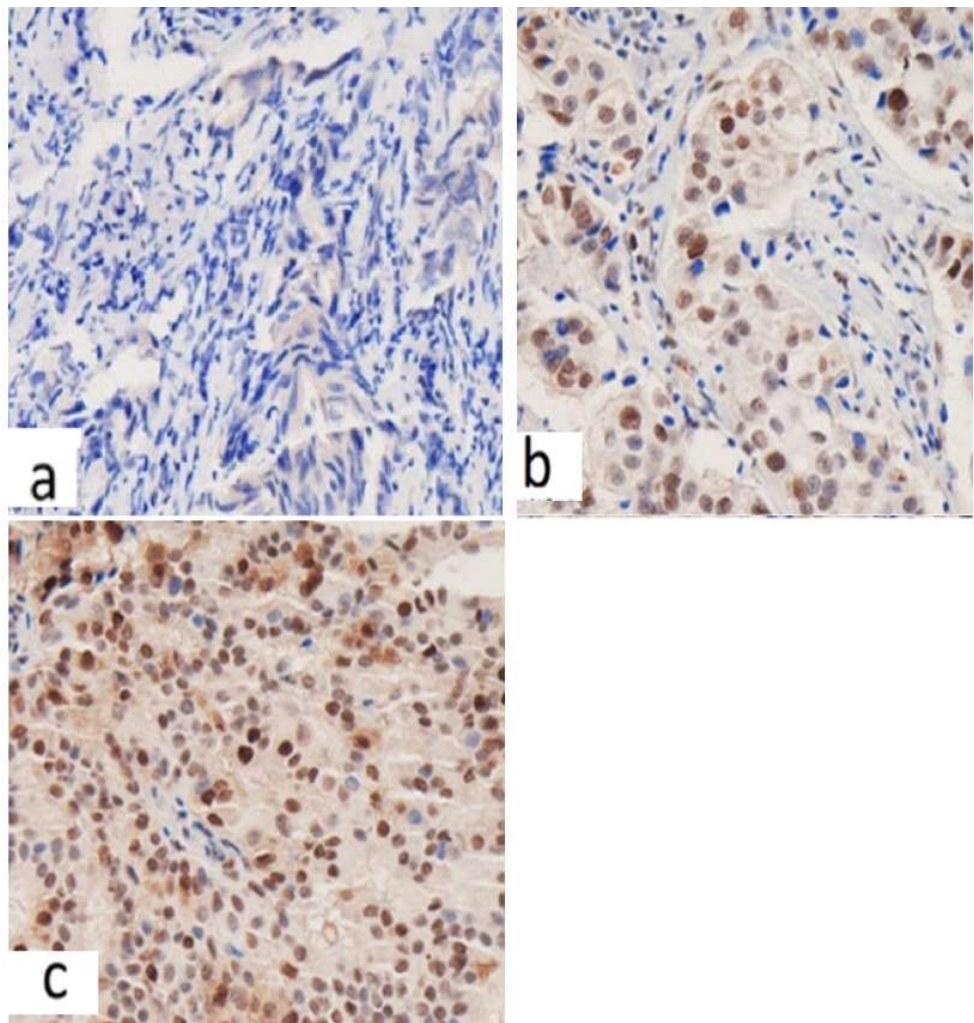


Fig 2: illustrates the expression. Note: a is the NKILA in situ hybridization images of the tumor tissue in the observation group under 400X magnifications; B is the NKILA in situ hybridization images of the adjacent cancer tissue in the observation group under 400X magnifications; C is the NKILA in situ hybridization images of the lesion tissue in the control group under 400X magnifications.

Serum IL-6, VEGF, and VEGFR2 Detection Results

Serum IL-6, VEGF, and VEGFR-2 levels in the observation group were significantly higher

compared to the control group (all $P < 0.05$) (Table 3).

Table 3: Comparison of serum IL-6, VEGF, and VEGFR-2 detection results between the observation and control groups ($\bar{x} \pm s$).

Group	IL-6 (ng/L)	VEGF (pg/ml)	VEGFR-2 (pg/ml)
Control group (n = 50)	0.42±0.07	102.03±16.15	140.75±26.07
Observation group (n = 400)	0.95±0.13	448.45±69.74	413.89±68.95
t	28.201	34.948	27.691
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Note: IL-6 is interleukin-6; VEGF is vascular endothelial growth factor; VEGFR-2 is VEGF receptor 2.

In the observation group, NKILA expression in tumor tissues was significantly negatively correlated with serum IL-6 ($r = -0.602$, $P = 0.011$), VEGF ($r = -0.659$, $P = 0.006$), and

VEGFR-2 ($r = -0.628$, $P = 0.009$) levels. No correlation was observed in the control group (all $P > 0.05$).

NKILA Expression in Tumor Tissues Infected with Different HPV Types

The relative expression and high expression rate of NKILA were significantly lower in tumor tissues of the HPV 16/18 infection group compared to the non-HPV 16/18 infection group and lower in the non-HPV 16/18 infection group compared to the non-HPV-infected group (all $P < 0.05$) (Table 4).

NKILA Expression in Tumor Tissues of Different Molecular Types

The relative expression and high expression rate of NKILA were significantly higher in the Luminal A and Luminal B groups compared to the HER-2 overexpression group and higher in the HER-2 overexpression group compared to the triple-negative group (all $P < 0.05$) (Table 4).

Table 4: Comparison of NKILA expression in tumor tissues of different molecular types in patients in the observation group

Group	NKILA relative Expression level ($\bar{x} \pm s$)	NKILA high expression [example(%)]
Luminal A type group (n=57)	1.45 $\pm$ 0.11	25 (61.40)
Luminal type B group (n=244)	1.49 $\pm$ 0.13 ^a	139(56.96) ^a
HER-2 overexpression group (n=39)	1.18 $\pm$ 0.07 ^b	13(33.33) ^b
Triple-negative group (n = 60)	0.94 $\pm$ 0.05 ^{ab}	14(23.33) ^{ab}

Note: Compared with the HER-2 overexpression group, ^a $P < 0.05$, and the Luminal A group, ^b $P < 0.05$. HER-2 is human epidermal growth factor receptor 2; NKILA is a nuclear factor, Sub- κ B interacting with long noncoding RNA.

NKILA Expression in Tumor Tissues of Patients with Different Prognoses

Among 400 patients in the observation group, 357 were effectively followed up for 19 to 37 months (median follow-up time: 31 months).

NKILA expression was compared between patients with different prognoses, showing significant differences related to recurrence and metastasis.

Table 5: Comparison of NKILA expression in tumor tissues of patients with different prognoses in the observation group

Group NKILA relative	Expression level ($\bar{x} \pm s$)	NKILA high expression [example (%)]
No recurrence and metastasis group (n = 107)	2.17 $\pm$ 0.18	71 (66.3)
Relapse and metastasis group (n = 250)	1.29 $\pm$ 0.11	105 (42)
t/χ^2	47.858	7.831
P	< 0.001	0.005

Note: NKILA is a long noncoding RNA interacting with nuclear factor κ B.

Discussion

HPV16/18 can immortalize human breast epithelial cells by reducing their dependency on external growth factors, a key early event in cancer development [7,8]. This virus is significant in breast cancer cases, particularly in regions with high infection rates, where it is often linked to axillary lymph node metastasis [9]. Accurate prognosis prediction in HPV16/18-infected breast cancer patients remains a focus of recent studies.

Traditional clinical staging for predicting breast cancer recurrence and metastasis has limitations, as patients with similar stages can

experience different outcomes. This highlights the complexity of breast cancer and the need for better prognostic tools [10]. NKILA, a long noncoding RNA, is an inhibitor of the NF- κ B pathway, often dysregulated in tumors. Elevated NF- κ B levels are associated with increased BCL-2 expression, apoptosis inhibition, and epithelial-mesenchymal transition, promoting cancer progression [3,11]. NKILA forms an I κ B complex, preventing NF- κ B activation, thus playing a critical role in metastasis suppression [11].

NKILA expression is higher in low-invasive cancer cell lines and lower in highly invasive

ones. In vitro studies show that the upregulation of NKILA significantly reduces cell migration and invasion [12]. Clinically, NKILA expression is highest in benign breast tissues, lower in adjacent tissues, and lowest in tumor tissues, suggesting its role in cancer progression. NKILA levels negatively correlate with IL-6, VEGF, and VEGFR-2, key markers linked to tumor growth, angiogenesis, and recurrence [13].

Additionally, HPV16/18-infected breast cancers show lower NKILA expression, suggesting a link between HPV infection and NKILA regulation. NKILA levels also vary by molecular subtype, being lowest in HER-2-overexpressing and triple-negative breast cancers, which are associated with poor prognosis [14]. Reduced NKILA expression correlates with higher recurrence and metastasis rates, making it a promising marker for personalized prognosis and treatment strategies.

Conclusion

NKILA expression is significantly reduced in breast cancer tissues, particularly in HPV 16/18-infected, TNBC, and HER-2-overexpressing tumors. Low NKILA expression is associated with poor prognosis, including higher rates of recurrence and metastasis. Future research should explore strategies to upregulate NKILA expression as a therapeutic approach.

References

1. Traves KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment. *Am Fam Physician*. 2021;104(2):171–8.
2. Khezrian A, Shojaeian A. Role of the Stromal Vascular Fraction in Breast Reconstruction after Breast Cancer Surgery: A Review. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2024;16(4):98-115.
3. Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Chou MC, Ko JL, Lee H. Human telomerase reverse transcriptase activated by E6 oncoprotein is required for human papillomavirus-16/18-infected lung tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*. 2008 ;14(22):7173-9.
4. Zhao RW, Guo ZQ, Zhang RX. Human papillomavirus infection and the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: a meta-analysis. *Journal of Clinical Virology*. 2016 Jun 1;79:36-43.
5. Chen R, Cheng Q, Owusu-Ansah KG, Song G, Jiang D, Zhou L, et al. NKILA, a prognostic indicator, inhibits tumor metastasis by suppressing NF-κB/Slug mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci* . 2020;16(3):495–503. DOI: 10.7150/ijbs.39582
6. Tibatan MA, Önay Uçar E. Long non-coding RNA NKILA regulates expression of

Recommendations for Further Research

Further studies with larger sample sizes are essential to validate the findings of this research. Investigating NKILA's role in different geographic populations and its relationship with breast density and other risk factors could provide deeper insights. Global multicenter studies are necessary to clarify the potential role of HPV in breast cancer and its impact on NKILA expression.

Acknowledgment

Great thanks to Dr. Hany Akeel Institute, Iraqi Medical Research Center for their great support

Ethical

This article is conducted under ethical committee regulation of the Iraqi Medical Research Center number 142-2017, with no human harmful effect possible and no interpretation of inpatient treatment.

Funding

None.

Conflict of interest

None

Authors Contribution

All Authors contributed equally to this research

- HSP90 α , NF- κ B and β -catenin proteins in the MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2021;48(5):4563–71. DOI: 10.1007/s11033-021-06482-y
7. Al-Hussaniy HA, Al-Zobaidy MJ. Cytotoxic effect of YH239-EE and its enantiomer on MCF7 cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2024; 25(6): 2133–2138.
 8. Jafari E, Zarshenas M, Toosi M, Nematollahi A, Sayadi M. The effect of self-care training programs on lifestyle and breast self-examination of immigrant Afghan women. *J Educ Health Promot.* 2023;12(1):14. DOI: 10.4103/jehp.jehp_332_22
 9. Mohsin SF, Al-Drobie B. Human papillomavirus expression in relation to biological behavior, Ki-67 proliferative marker, and P53 prognostic marker in Schneiderian papilloma. *J Med Life.* 2023;16(7):1022–7. DOI: 10.25122/jml-2022-0312
 10. Shaaban SM, Gaber Z, Semary S, Dewidar AM. Impact of Vitamin B12 on outcome of Early Stage Luminal A and B Breast Cancer, single center experience. *Medical and Pharmaceutical Journal.* 2023;2(1):17–27.
 11. Al-Hussaniy H. The effect of MicroRNA-409-3p for treatment and response to tumor proliferation of lung cancer cell lines (in vitro). *Asian Pacific journal of cancer prevention.* 2022;23.
 12. Lu Z, Chen Z, Li Y, Wang J, Zhang Z, Che Y, et al. TGF- β -induced NKILA inhibits ESCC cell migration and invasion through NF- κ B/MMP14 signaling. *J Mol Med.* 2018;96(3–4):301–13. Available from: DOI:10.1007/s00109-018-1621-1
 13. Corredor G, Toro P, Koyuncu C, Lu C, Buzzy C, Bera K, et al. An imaging biomarker of tumor-infiltrating lymphocytes to risk-stratify patients with HPV-associated oropharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2022;114(4):609–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djab215>
 14. Alwan NAS, Tawfeeq FN, Muallah FH. Breast cancer subtypes among Iraqi patients: Identified by their ER, PR and HER2 status. *J Fac Med Baghdad.* 2018;59(4):303–7. DOI: 10.32007/jfacmedbagdad.59469.

بررسی بیان *RNA* غیر کدکننده (مرتبط با *NF-κB*) و پیامدهای بالینی آن در بیماران مبتلا به سرطان پستان و آلوده به ویروس پاپیلومای انسانی تایپ‌های ۱۶ و ۱۸

نور ولید هاشم^۱، منار سرهان احمد^۲، علی یوسف نوری^۳، هانی ع. الحسینی^{۴،۵}

^۱گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، دانشگاه مستنصریه، بغداد، عراق

^۲گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه الفراهیدی، بغداد، عراق

^۳گروه داروسازی، دانشکده دانشگاه المصطفی، بغداد، عراق

^۴گروه داروسازی، دانشکده دانشگاه النیسور، بغداد، عراق

^۵موسسه دکتر هانی آکیل، مرکز تحقیقات پزشکی عراق، بغداد، عراق

چکیده

مقدمه: این مطالعه به تحلیل تعامل فاکتور هسته‌ای (NKILA) *κB* غیر کدکننده بلند زنجیره در بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) نوع ۱۸/۱۶ پرداخته و ارتباط آن را با پیش‌آگهی سرطان پستان مورد بررسی قرار می‌دهد.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۷/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۵

* نویسنده مسئول:

Hany_akeel2000@yahoo.com

روش بررسی: ۴۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان (گروه مشاهده) و ۵۰ بیمار مبتلا به بیماری‌های خوش‌خیم پستان (گروه کنترل) که در بیمارستان‌های الکرامه و الیرموک از ژانویه ۲۰۱۷ تا ژانویه ۲۰۲۲ بستری شده بودند، انتخاب شدند. بیان NKILA با استفاده از روش‌های ELISA و qPCR و سطح شاخص‌های سرمی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان نسبی NKILA در بافت توموری بیماران گروه مشاهده به‌طور معنی‌داری کمتر از بافت مجاور بود ($P < 0.05$) و بیان نسبی NKILA در بافت مجاور نیز به‌طور قابل‌توجهی کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری گروه مبتلا به عفونت HPV 16/18 به‌طور قابل‌توجهی کمتر از گروه غیرمبتلا به عفونت HPV 16/18 بود. همچنین، بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری گروه عود و متاستاز کمتر از گروه بدون عود و متاستاز بود (همگی $P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بیان NKILA در ضایعات سرطان پستان نسبت به بافت‌های مجاور و ضایعات خوش‌خیم به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است. این کاهش در بیماران مبتلا به عفونت HPV 16/18، سرطان پستان سه‌گانه منفی و کسانی که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند، شدیدتر است. علاوه‌براین، بیان NKILA در بیماران مبتلا به سرطان پستان عود کرده و متاستاز داده به‌طور چشمگیری پایین‌تر است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که NKILA می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی بالقوه برای پیشرفت بیماری و عود در سرطان پستان مرتبط با HPV مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور مکمل B، ویروس پاپیلومای انسانی، گروه‌های کنترل، نتوپلاسم‌های پستان سه‌گانه منفی

مقدمه

سرطان پستان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر ناشی از بیماری‌ها در زنان در سراسر جهان است. مطالعه‌ای اخیر نشان داده است که سرطان پستان آلوده به HPV 16/18 دارای نرخ عود قابل توجهی بیشتر و بقا بدون بیماری کوتاه‌تر نسبت به سرطان‌های غیرآلوده یا بدون بیان مثبت P16 است. متأسفانه، انکوپروتئین‌های HPV 16/18 می‌توانند بیان رونویسی RNA غیرکدکننده را از طریق NF-κB تسهیل کرده و سپس موجب تنظیم افزایشی ژن‌های هدف NF-κB شوند و در نهایت یک مدار تنظیمی مثبت از NF-κB در بیماری‌های مرتبط با HPV ایجاد کنند [۲،۱]. با این حال، تحقیقات کمی بر روی اهمیت بالینی این ژن و نتایج بالینی آن در سرطان پستان آلوده به HPV 16/18 انجام شده است [۴،۳].

ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV) گروهی از ویروس‌های DNA غیرپوشش‌دار هستند که سلول‌های اپیتلیال سنگفرشی پوست، مخاط تناسلی و حفره دهانی را آلوده می‌کنند. تقریباً ۹۰ نوع از HPV می‌توانند مقعد، اندام تناسلی و حفره دهانی را آلوده کنند. اکثر عفونت‌ها به‌صورت خودبه‌خود از بین می‌روند و بدون علامت هستند. با این حال، عفونت‌های پایدار HPV پرخطر موجب انواع مختلفی از سرطان‌ها می‌شوند که از جمله می‌توان به سرطان‌های دهانه رحم، مقعد و کارسینوم‌های دهانی حلقی اشاره کرد. علاوه بر این، HPV 16/18 شایع‌ترین نوع پرخطر HPV است که با ایجاد سرطان ارتباط دارد و بیش از ۵۰ درصد از بسیاری از انواع سرطان‌ها نظیر سرطان دهانه رحم و برخی از سرطان‌های سر و گردن ژنوم HPV 16/18 را بیان می‌کنند. عفونت‌های پایدار HPV پرخطر علت اصلی سرطان‌های دهانه رحم، مقعد و دهانی حلقی هستند. سرطان دهانه رحم چهارمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان است و تخمین زده می‌شود که سالانه ۲۶۶،۰۰۰ مرگ و ۵۲۸،۰۰۰ مورد جدید در سطح جهانی رخ می‌دهد. سومین سرطان شایع، سرطان دهانی حلقی است که تنها در اروپا، انواع کمتر تهاجمی آن سالانه ۵ درصد افزایش یافته و حدود ۱۶،۴۷۶ مرگ گزارش شده است. هفتاد درصد موارد سرطان دهانی حلقی ناشی از HPV 16 است، به‌طوری که برخی مطالعات نشان داده‌اند که بیماران HPV 16+ نسبت به بیماران HPV 16- بقای کلی بهتری دارند [۴].

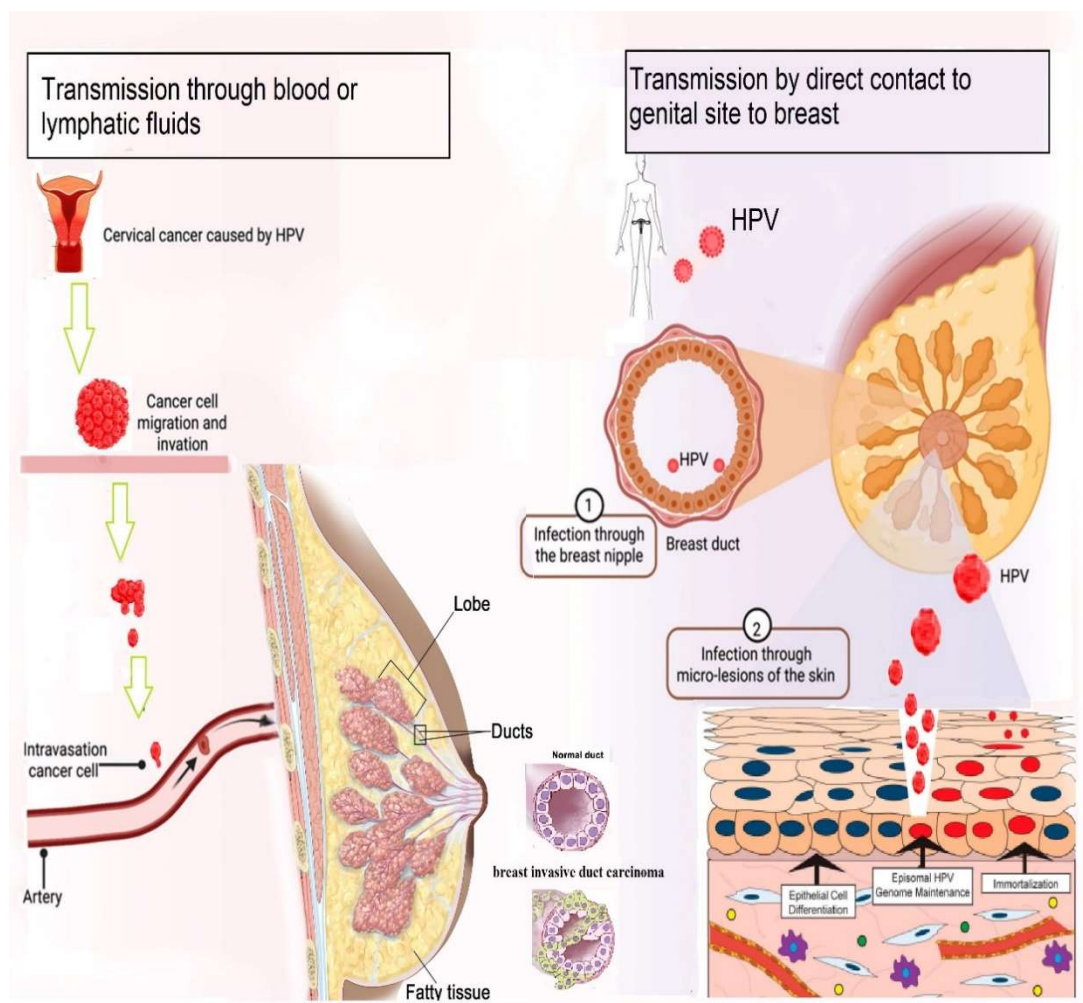
ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) یک ویروس DNA است که بافت‌های اپیدرمی و مخاطی انسان را آلوده می‌کند. این ویروس دارای بیش از ۲۰۰ نوع است که به انواع پرخطر و کم‌خطر تقسیم می‌شوند [۶،۵]. این ویروس یکی از علل مهم عفونی در مردان و زنان به شمار می‌رود [۵]. انواع ۱۶ و ۱۸ HPV شایع‌ترین انواع پرخطر هستند که با بروز ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم، سرطان دهانه رحم و سرطان دستگاه تناسلی خارجی در مردان و زنان مرتبط هستند. بیش از ۷۰ درصد سرطان‌های دهانه رحم ناشی از HPV نوع ۱۶ و ۱۸ است [۸،۷]. با این حال، انواع ۶ و ۱۱ HPV شایع‌ترین انواع کم‌خطر هستند. روش‌های احتمالی انتقال آن در شکل ۱ نشان داده شده است.

HPV 16/18 یک HPV پرخطر محسوب می‌شود و این دو زیرگروه ویروسی به‌طور نزدیک با سرطان دهانه رحم مرتبط هستند. در سال‌های اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که عفونت HPV 16/18 ممکن است با سرطان پستان نیز مرتبط باشد [۹،۸].

RNA غیرکدکننده (مرتبط با NF-κB)

گزارش شده است که عفونت‌های ویروسی با نتایج بدتر در بسیاری از سرطان‌ها نظیر سرطان دهانه رحم و کارسینوم نازوفارنژیال مرتبط هستند. زیرگروه‌های پرخطر HPV در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان نقش دارند. تاکنون، استراتژی‌هایی برای مدیریت بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به HPV پرخطر وجود ندارد. این تحقیق فرض می‌کند که RNA غیرکدکننده ممکن است در مکانیسم پیشرفت و توسعه سرطان پستان در بیماران HPV مثبت پرخطر نقش داشته باشد و بتواند به‌عنوان یک هدف درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به HPV پرخطر مورد استفاده قرار گیرد. شمارش سلولی برای ارزیابی اثر تغییر بیان HPV بر ژن تحت کنترل پروموتور استفاده شد. سطوح پروتئینی ژن‌های مرتبط در سلول‌های سرطان پستان HPV مثبت و منفی و ضایعات سرطانی با استفاده از روش وسترن بلات شناسایی شدند.

بر این اساس، مطالعه ما با هدف بررسی ارتباط بین NKILA (NF-κB) و عفونت HPV، تایپ مولکولی و پیش‌آگهی در بیماران مبتلا به سرطان پستان طراحی شده است تا ایده‌های جدیدی برای بررسی مکانیسم‌های توسعه سرطان پستان و اهداف درمانی ارائه دهد و درک بالینی از NKILA را تقویت کند.



شکل ۱: تصویر فوق، نشان‌دهنده روش پیشنهادی انتقال HPV است.

Fig 1: shows the proposed method of transmission of HPV.

معیارهای ورود به مطالعه

ابتدا باید سرطان پستان با استفاده از هیستوپاتولوژی تأیید شود؛ بیماران باید به‌تازگی تشخیص سرطان پستان دریافت کرده باشند و پیش از ورود به مطالعه هیچ‌گونه درمان ضدتومور سیستمیک یا درمان مرتبط با عفونت HPV دریافت نکرده باشند؛ بیماران باید شرایط لازم برای درمان جراحی را داشته باشند و قصد دریافت درمان در بیمارستان‌های الکرماه و الیرموک را داشته باشند؛ بیماران باید توانایی همکاری با این مطالعه و شرکت در پیگیری‌های آن را داشته باشند [۱۰].

معیارهای خروج از مطالعه

بیماران مبتلا به سایر تومورهای بدخیم؛ بیماران دارای ضایعات شدید در قلب، کبد، کلیه و سایر اندام‌ها؛ بیماران مبتلا به سرطان پستان عود کرده در مراحل پیشرفته؛

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و شرکت‌کنندگان

بیماران مبتلا به سرطان پستان که از ژانویه ۲۰۱۷ تا ژانویه ۲۰۲۲ در بیمارستان‌های الکرماه و الیرموک بستری شده بودند، در این مطالعه آینده‌نگر شرکت داشتند.

شرکت‌کنندگان

اطلاعات بالینی کافی برای هر بیمار استخراج و بر اساس نوع سرطان، از کارسینوم مجاری غیرتهاجمی تا کارسینوم مجاری درجا، طبقه‌بندی شد. نتایج بالینی بیماران مبتلا به سرطان پستان، شامل بقا بدون متاستاز دوردست، به‌عنوان معیار ارزیابی نتایج استفاده شد. نمونه‌های باقی‌مانده از عمل‌های جراحی که حاشیه‌های برش نزدیک نداشتند، از نظر یکپارچگی نمونه، کیفیت، وزن حداقل ۰/۵ گرم و احتمال عود تا ۵ سال ثبت و پردازش شدند.

(تاکارا، ژاپن) استفاده شد و برای اندازه‌گیری بیان NKILA از روش کمی فلورسانس در زمان واقعی استفاده شد. بیان NKILA به صورت بیان نسبی گزارش شد (بیان نسبی نشان‌دهنده چگالی نوری نسبی بیان مثبت NKILA است). بخشی از بافت در پارافورمالدهید تثبیت و سپس در پارافین قرار داده شد و برای تشخیص هیبریداسیون درجا (in situ hybridization) برش زده شد [۱۱].

بر اساس داده‌های سازمان سرطان پستان درباره میزان بیان نسبی NKILA، سطوح بیان بالا و پایین NKILA به این صورت تعریف شدند: مقادیر بیان نسبی NKILA در بافت‌های سرطان پستان از بیشترین به کمترین مرتب شده و به چهار بازه ۰٪، ۰٪، ۵۰٪، ۷۵٪ و ۱۰۰٪ تقسیم شدند. به عنوان مثال، ۲۵ درصد بالایی موقتاً به عنوان گروه بیان بالا در نظر گرفته شد و ۷۵٪ پایینی موقتاً به عنوان گروه بیان پایین قرار گرفتند تا بررسی شود آیا ارتباطی میان بیان بالای NKILA و طبقه‌بندی مولکولی سرطان پستان وجود دارد یا خیر [۱۲-۱۴].

اگر ارتباط مشخص نشد، ۵۰ درصد بالایی موقتاً به عنوان گروه بیان بالا و ۵۰ درصد پایینی موقتاً به عنوان گروه بیان پایین در نظر گرفته شدند و تحلیل ارتباطی مجدداً انجام شد. این فرآیند ادامه یافت تا زمانی که مشخص شد ۵۰ درصد بالایی به عنوان گروه بیان بالا و ۵۰ درصد پایینی به عنوان گروه بیان پایین تعریف شود. در این مرحله مشخص شد که بیان بالای NKILA با طبقه‌بندی مولکولی سرطان پستان مرتبط است. همچنین، بیان نسبی NKILA بیشتر از ۱/۱۵۲ به عنوان بیان بالا و بیان نسبی NKILA برابر یا کمتر از ۱/۱۵۲ به عنوان بیان پایین تعریف شد.

- تشخیص عفونت HPV

برای تشخیص عفونت HPV در گروه مشاهده، از پلتفرم تحلیل چیپ مایع چندمنظوره Luminex 200 همراه با کیت تشخیص تایپینگ HPV (ساخت شرکت Shanghai Tojing Life Technology Co., Ltd) استفاده شد. بر اساس وضعیت عفونت HPV 16/18 در بیماران، آن‌ها به سه گروه تقسیم شدند: گروه مبتلا به HPV 16/18، گروه مبتلا به سایر انواع HPV و گروه بدون عفونت HPV.

بیمارانی که قبلاً واکسن HPV دریافت کرده‌اند؛ بیمارانی که پس از تشخیص سرطان پستان به عفونت HPV مبتلا شده‌اند.

۴۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان که معیارهای ورود به مطالعه را داشتند، در گروه مشاهده وارد شدند. همچنین، ۵۰ بیمار مبتلا به بیماری‌های خوش‌خیم پستان (فیبروآدنوما) که در همان دوره تحت درمان جراحی قرار گرفته و به صورت داوطلبانه در مطالعه شرکت کردند، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند.

سن بیماران گروه مشاهده بین ۲۴ تا ۶۹ سال با میانگین سنی (6.92 ± 45.78) سال بود. سن بیماران گروه کنترل بین ۲۳ تا ۷۲ سال با میانگین سنی (6.55 ± 46.11) سال بود. هیچ تفاوت آماری معنی‌داری از نظر سنی بین دو گروه مشاهده نشد ($P > 0.05$) و این دو گروه قابل مقایسه بودند. تمامی بیماران رضایت آگاهانه برای شرکت در این مطالعه را ارائه دادند و به صورت داوطلبانه در آن شرکت کردند.

روش‌های تشخیصی

- تشخیص بیان NKILA

در طول عمل جراحی، ۳۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از تومورهای پستانی از بیماران گروه مشاهده برداشته شد و از گروه کنترل و همچنین بافت‌های مجاور گروه مشاهده نمونه‌برداری شد. پس از جداسازی، بخشی از بافت در لوله سانتریفیوژ قرار داده شد. پس از تکان دادن، نمونه با سرعت ۱۲,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد (شعاع سانتریفیوژ ۳ سانتی‌متر)، مایع رویی دور ریخته شد، اتانول مطلق اضافه شد و نمونه به مدت ۱۰ ثانیه تکان داده شد؛ سپس سانتریفیوژ انجام شد تا رسوب حفظ شود. به نمونه بافر اضافه شده و به حالت تعلیق درآمده، سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد، نمونه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس پروتئین حذف شد. پس از شستشو با فنل اشباع‌شده، کلروفرم، اتانول مطلق و سایر معرف‌ها، نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای بررسی ذخیره شد.

از اسپکتروفوتومتر A 2000 با حجم فوق‌العاده کوچک برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص RNA استفاده شد (مقادیر A در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بین ۱.۹ تا ۲.۱). برای تبدیل RNA به cDNA از کیت PrimeScript™ RT همراه با gDNA Eraser Reverse Transcription Kit

- شاخص‌های سرمی

برای انجام آزمایش، ۲ میلی‌لیتر خون وریدی ناشتا از ورید کوبیتال هر دو گروه بیماران در ساعات اولیه صبح جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در لوله آزمایش استریل قرار داده شدند و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داشته شدند. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه (شعاع سانتریفیوژ ۳ سانتی‌متر)، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شده و به بخش‌های کوچکتر تقسیم‌بندی شد تا برای آزمایش استفاده شود.

از روش الایزا^۱ برای اندازه‌گیری سطوح سرمی اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۲ (VEGF) و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR2) استفاده شد [۱۵]. کیت Human ELISA Kit از شرکت Invitrogen Thermo Fisher Scientific Co., Ltd. خریداری شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل

- تحلیل بیان NKILA

بیان NKILA در بافت ضایعه بین گروه مشاهده و گروه کنترل مقایسه شد. همچنین نتایج اندازه‌گیری سرمی اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR-2) نیز مورد بررسی قرار گرفت. سپس ارتباط میان بیان NKILA در بیماران مبتلا به سرطان پستان و نتایج اندازه‌گیری IL-6، VEGF و VEGFR-2 تحلیل شد.

- تحلیل ارتباط بین بیان NKILA، عفونت HPV،

زیرگروه‌های مولکولی سرطان پستان و پیش‌آگهی

بیان NKILA در بافت‌های ضایعه بیماران با عفونت‌های مختلف HPV، زیرگروه‌های مولکولی مختلف سرطان پستان و پیش‌آگهی‌های متفاوت مقایسه شد. طبقه‌بندی مولکولی سرطان پستان براساس اجماع بین‌المللی متخصصان سرطان پستان سن گالن [۴].

نوع لومینال A به گیرنده استروژن (ER) و/یا گیرنده پروژسترون (PR) مثبت و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی نوع ۲ (HER-2) منفی با Ki-67 کمتر از ۱۴ درصد اطلاق می‌شود. نوع لومینال B شامل ER و/یا PR مثبت و HER-2 منفی با Ki-67 برابر یا بیشتر از ۱۴ درصد، یا ER و/یا PR مثبت، HER-2 مثبت با Ki-67 در هر سطحی است. نوع با بیان بیش از حد HER-2 به ER منفی، PR منفی و HER-2 مثبت گفته می‌شود. نوع سه‌گانه منفی^۳ به مواردی اطلاق می‌شود که ER، PR و HER-2 همگی منفی باشند.

برای تحلیل پیش‌آگهی، از پیگیری‌های تلفنی و ثبت داده‌های مراجعات سرپایی استفاده شد. بیماران به مدت سه سال برای بررسی عود و متاستاز تحت پیگیری قرار گرفتند و نتایج آزمایش‌های پاتولوژی به‌عنوان معیار ارزیابی عود و متاستاز استفاده شد.

بر اساس نتایج پیگیری، بیماران به گروه‌های دارای عود و متاستاز تقسیم شدند. ارتباط این گروه‌ها با بیان NKILA در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: طبقه‌بندی و گروه‌بندی بیماران بر اساس عود و متاستاز و همچنین بر اساس بیان NKILA آن‌ها

Table 1: Classification and grouping of the patient according to recurrence and metastasis and according to their expression of NKILA

Groups	Number of patients
recurrence and metastasis group	250
non-recurrence and metastasis group	107
high-expression group NKILA	240
NKILA low-expression group	254

گردید. داده‌های اندازه‌گیری که با توزیع نرمال همخوانی داشتند، به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($x \pm s$) بیان شدند و تحلیل آن‌ها با استفاده از آزمون t گروهی یا آزمون F انجام شد.

- روش‌های آماری

برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲.۰ استفاده شد. داده‌های شمارشی به‌صورت تعداد موارد (%) گزارش شدند و برای تحلیل آن‌ها از آزمون کای دو (χ^2) استفاده

³ Triple negative

¹ Enzyme-linked immunosorbent assay

² vascular endothelial growth factor

بیان NKILA

بیان نسبی NKILA در بافت‌های توموری گروه مشاهده به‌طور معنی‌داری کمتر از بافت‌های مجاور تومور و بافت ضایعه گروه کنترل بود (همگی $P < 0.05$) (جدول ۲، شکل ۱).

برای تحلیل همبستگی از روش پیرسون^۱ استفاده گردید. امتیازات بقا بدون عود با روش کاپلان-مایر^۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار $P < 0.05$ به معنای وجود تفاوت آماری معنی‌دار است.

نتایج

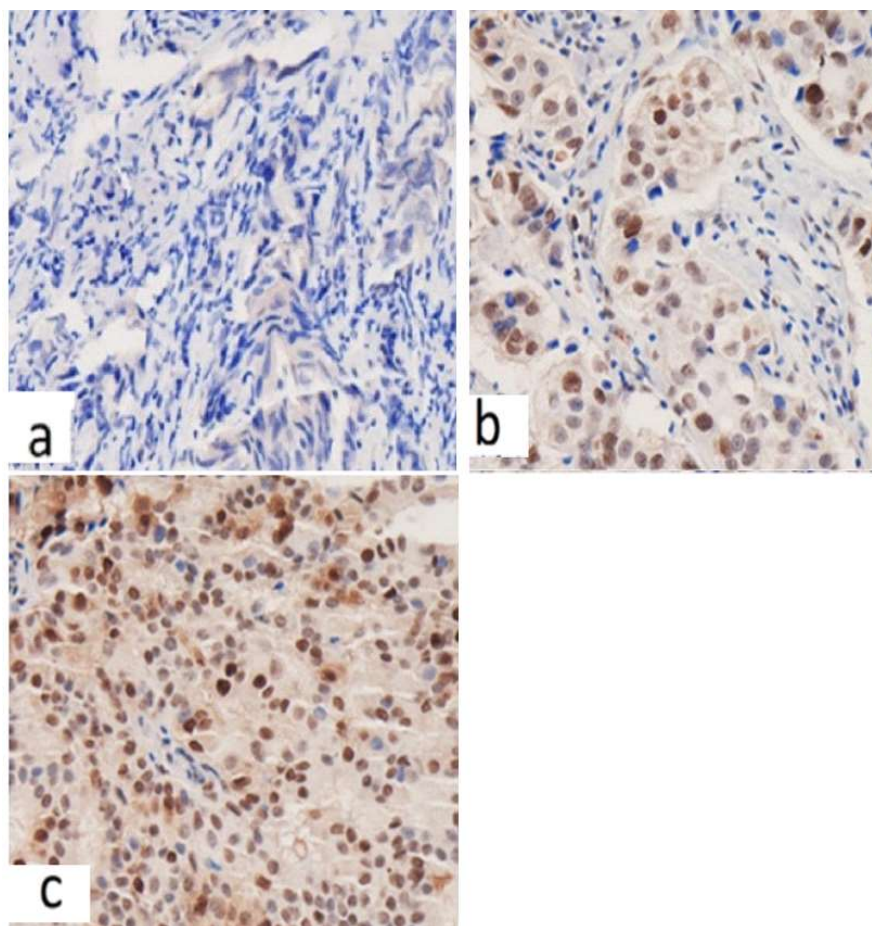
جدول ۲: مقایسه بیان NKILA در بافت ضایعه بین گروه مشاهده و گروه کنترل ($\bar{x} \pm s$)

Table 2: Comparison of NKILA expression in lesion tissue between the observation group and the control group ($\bar{x} \pm s$)

NKILA expression	Group
16.95±2.80	Control group (n = 50)
1.36±0.22	Observation group (n = 400)

P value <0.001

توضیح: در مقایسه با بافت توموری $P < 0.05$ ؛ در مقایسه با بافت مجاور $P < 0.05$. NKILA: یک RNA بلند غیر کدکننده است که با فاکتور هسته‌ای κB تعامل دارد.



شکل ۲: تصاویر بیان NKILA؛ توضیح: A: تصاویر هیبریداسیون درجا^۲ NKILA در بافت توموری گروه مشاهده تحت بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. B: تصاویر هیبریداسیون درجا NKILA در بافت مجاور تومور گروه مشاهده تحت بزرگنمایی ۴۰۰ برابر و C: تصاویر هیبریداسیون درجا NKILA در بافت ضایعه گروه کنترل تحت بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

Fig 2: illustrates the expression. Note: a is the NKILA in situ hybridization images of the tumor tissue in the observation group under 400X magnifications; B is the NKILA in situ hybridization images of the adjacent cancer tissue in the observation group under 400X magnifications; C is the NKILA in situ hybridization images of the lesion tissue in the control group under 400X magnifications.

³ in situ hybridization

¹ Pearson

² Kaplan-Meier

مشاهده به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (همگی $P < 0.05$) (جدول ۳).

نتایج اندازه‌گیری IL-6، VEGF و VEGFR-2 سرمی سطوح IL-6، VEGF و VEGFR-2 سرمی در گروه

جدول ۳: مقایسه نتایج اندازه‌گیری IL-6، VEGF و VEGFR-2 سرمی بین گروه مشاهده و گروه کنترل

Table 3: Comparison of serum IL-6, VEGF, and VEGFR-2 detection results between the observation and control groups ($\bar{x} \pm s$).

Group	IL-6 (ng/L)	VEGF (pg/ml)	VEGFR-2 (pg/m)
Control group (n = 50)	0.42±0.07	102.03±16.15	140.75±26.07
Observation group (n = 400)	0.95±0.13	448.45±69.74	413.89±68.95
t	28.201	34.948	27.691
p	<0.001	<0.001	<0.001

توضیح: IL-6 به معنای اینترلوکین-۶ است؛ VEGF به معنای فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است؛ VEGFR-2 به معنای گیرنده ۲ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است.

HPV 16/18) بود. همچنین، بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری گروه آلوده به سایر انواع HPV به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه بدون عفونت HPV بود (همگی $P < 0.05$) (جدول ۴).

بیان NKILA در بافت‌های توموری انواع مختلف مولکولی

بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری بیماران گروه‌های لومینال A و لومینال B به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه با بیان بیش‌ازحد HER-2 بود (همگی $P < 0.05$). همچنین، بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری بیماران گروه با بیان بیش‌ازحد HER-2 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه سه‌گانه منفی بود (همگی $P < 0.05$) (جدول ۴).

تحلیل همبستگی

بیان NKILA در بافت توموری گروه مشاهده با سطوح سرمی IL-6 ($r = -0.11$, $P = 0.06$)، VEGF ($r = -0.62$, $P = 0.006$)، و VEGFR-2 ($r = -0.65$, $P = 0.009$)، همبستگی منفی معناداری داشتند (همگی $P < 0.05$). در گروه کنترل، هیچ همبستگی میان بیان NKILA در بافت ضایعه و سطوح سرمی IL-6، VEGF و VEGFR-2 مشاهده نشد (همگی $P > 0.05$).

بیان NKILA در بافت‌های توموری آلوده به انواع مختلف HPV در گروه مشاهده

بیان نسبی NKILA و نرخ بیان بالای NKILA در بافت‌های توموری گروه آلوده به HPV 16/18 به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه آلوده به سایر انواع HPV (غیر از

جدول ۴: مقایسه بیان NKILA در بافت‌های توموری انواع مولکولی مختلف در بیماران گروه مشاهده

Table 4: Comparison of NKILA expression in tumor tissues of different molecular types in patients in the observation group

Group	NKILA relative Expression level ($\bar{x} \pm s$)	NKILA high expression [example (%)]
Luminal A type group (n=57)	1.45±0.11	25 (61.40)
Luminal type B group (n=244)	1.49±0.13 ^a	139 (56.96) ^a
HER-2 overexpression group (n=39)	1.18±0.07 ^b	13 (33.33) ^b
Triple-negative group (n = 60)	0.94±0.05 ^{ab}	14 (23.33) ^{ab}

توضیح: در مقایسه با گروه با بیان بیش‌ازحد HER-2، $P < 0.05$ ؛ در مقایسه با گروه لومینال A، $P < 0.05$ ؛ ^aHER-2 به معنای گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی نوع ۲ است؛ NKILA یک RNA بلند غیر کدکننده است که با فاکتور هسته‌ای Sub-κB تعامل دارد.

بیان NKILA در بافت‌های توموری بیماران با پیش‌آگهی‌های مختلف

از میان ۴۰۰ بیمار در گروه مشاهده، ۳۵۷ بیمار به‌طور مؤثر تحت پیگیری قرار گرفتند. مدت زمان پیگیری بین ۱۹ تا ۳۷ ماه متغیر بود و میانگین این مدت زمان ۳۱ ماه بود.

مقایسه بیان NKILA در بافت‌های توموری بیماران با پیش‌آگهی‌های مختلف در گروه مشاهده، شامل مقادیر بیان نسبی NKILA و تعداد موارد با بیان بالای NKILA (درصد)، در جدول ۵ ارائه شده است.

جدول ۵: مقایسه بیان NKILA در بافت‌های توموری بیماران با پیش‌آگهی‌های مختلف در گروه مشاهده

Table 5: Comparison of NKILA expression in tumor tissues of patients with different prognoses in the observation group

Group NKILA relative	Expression level (x±s)	NKILA high expression [example (%)]
No recurrence and metastasis group (n = 107)	2.17±0.18	71 (66.3)
Relapse and metastasis group (n = 250)	1.29±0.11	105 (42)
t/χ ²	47.858	7.831
P	< 0.001	0.005

توضیح: NKILA یک RNA بلند غیرکدکننده است که با فاکتور هسته‌ای κB تعامل دارد.

بحث

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) انواع ۱۶ و ۱۸ قادر به نامیرا کردن سلول‌های طبیعی اپیتلیال پستان انسان هستند. محصولات ژنی این ویروس می‌توانند فرآیند نامیرایی را تسهیل کرده و نیاز سلول‌ها به فاکتورهای رشد خارجی را کاهش دهند [۱۶، ۱۷]. این ویروس یکی از عوامل مهمی است که می‌تواند در بروز سرطان پستان نقش داشته باشد [۱۸]. در میان بیماران مبتلا به سرطان پستان، عفونت با انواع ۱۶ و ۱۸ این ویروس نسبتاً شایع بوده و اغلب با افزایش خطر متاستاز به گره‌های لنفاوی زیر بغل همراه است [۱۹، ۲۰]. بنابراین، در سال‌های اخیر توجهات بالینی به پیش‌بینی و ارزیابی پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به HPV16/18 افزایش یافته است. مرحله‌بندی بالینی، یکی از روش‌های سنتی برای پیش‌بینی عود و متاستاز سرطان پستان است. با این حال، بیماران با همان نوع و مرحله بافت‌شناسی ممکن است نتایج درمانی کاملاً متفاوتی را تجربه کنند، حتی زمانی که از یک رژیم درمانی استاندارد مشابه استفاده می‌شود. این تفاوت‌های عمده نشان‌دهنده ناهمگونی قابل توجه سرطان پستان است و بر لزوم استفاده از ابزارهای پیش‌بینی‌کننده دقیق‌تر تأکید دارد [۵].

NKILA یک RNA غیرکدکننده بلند (lncRNA) است که به‌عنوان یک مهارکننده کلیدی مسیر سیگنالینگ NF-κB عمل می‌کند. فعال‌سازی غیرطبیعی این مسیر در

بافت‌های توموری امری رایج است. تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش NF-κB در بیماران مبتلا به سرطان پستان با افزایش بیان BCL-2، مهار آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) و تسهیل گذار اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) مرتبط است [۳، ۴، ۲۱]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که NKILA می‌تواند به p65، یکی از اعضای خانواده NF-κB متصل شده و با تشکیل یک کمپلکس مهاري κB، از فعال‌سازی NF-κB از طریق مسیر فسفریلاسیون IκB جلوگیری کند. این مکانیسم نقشی اساسی در جلوگیری از متاستاز سرطان پستان دارد. همچنین، بیان NKILA در رده‌های سلولی سرطان پستان با میزان تهاجم کم، بالا بوده و در رده‌های سلولی با تهاجم بالا، پایین است [۲۱-۲۴].

علاوه بر این، آزمایش‌های مهاجرت و تهاجم سلولی نشان داده‌اند که در رده سلولی سرطان کبد SMMC-7721، افزایش بیان NKILA می‌تواند تعداد سلول‌های مهاجر را تا ۳۱/۷۲٪ کاهش داده و همچنین تعداد سلول‌های تهاجمی را به میزان قابل توجهی کم کند. این یافته، اهمیت NKILA را در تنظیم مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی تأیید می‌کند [۲۵].

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان NKILA در بافت ضایعات خوش‌خیم پستان بالاست، در حالی که در بافت‌های مجاور سرطان پستان این میزان کاهش یافته است. با این حال، کاهش بیان NKILA در بافت‌های سرطانی پستان بیشتر بوده که نشان می‌دهد این RNA

غیرکدکننده می‌تواند در بروز و پیشرفت سرطان پستان نقش مهمی ایفا کند. برای بررسی دقیق‌تر این ارتباط، مطالعه حاضر به تحلیل همبستگی بین NKILA و فاکتورهای IL-6، VEGF و VEGFR-2 در بیماران پرداخته است. یافته‌ها نشان داد که سطح سرمی IL-6، VEGF و VEGFR-2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان به‌طور معناداری افزایش یافته است. علاوه بر این، بیان NKILA در بافت‌های توموری با این شاخص‌ها رابطه معکوس نشان داد. از یک سو، این نتایج نشان می‌دهند که IL-6، VEGF و VEGFR-2 با بروز و پیشرفت سرطان پستان ارتباط نزدیکی دارند. از سوی دیگر، یافته‌ها بر نقش مهم NKILA در روند بیماری تأکید دارند.

IL-6 به‌عنوان یک سایتوکاین چندکاره، در پیشرفت سرطان‌های مختلف از جمله مولتیپل میلوما، سرطان کلیه و تومورهای گوارشی نقش دارد و با مقاومت شیمی‌درمانی ارتباط دارد [۲۶]. VEGF یکی از قوی‌ترین محرک‌های رگ‌زایی است و VEGFR-2 نقش کلیدی در تنظیم این فرایند ایفا می‌کند. اتصال VEGF به گیرنده VEGFR-2 منجر به فعال‌سازی سیگنال‌های میانجی در مسیرهای بالادستی و پایین‌دستی شده و باعث تکثیر، بقا، مهاجرت، افزایش نفوذپذیری اندوتلیال و در نهایت، توسعه و عود تومور می‌شود [۲۷]. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که NKILA قادر است از طریق مسیرهای NF- κ B و IL-6 فرآیند رگ‌زایی سرطان پستان را مهار کند و افزایش بیان NKILA باعث تقویت آپوپتوز و سرکوب رگ‌زایی می‌شود که یافته‌های این مطالعه را تأیید می‌کند [۱۳]. این نتایج نشان می‌دهند که یافتن اهدافی برای افزایش بیان NKILA در بافت‌های توموری می‌تواند به توسعه روش‌های درمانی هدفمند جدید برای سرطان پستان کمک کند.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که بیان NKILA در بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به HPV16/18 بیشتر کاهش یافته است. این موضوع نشان می‌دهد که سطح بیان NKILA ممکن است با عفونت HPV و نوع آن مرتبط باشد، اما مکانیسم دقیق این ارتباط هنوز مشخص نیست و به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

علاوه بر ارتباط با عفونت HPV، سطح بیان NKILA با نوع مولکولی سرطان پستان و پیش‌آگهی بیماران نیز مرتبط است. نتایج نشان داد که در بیماران مبتلا به سرطان پستان HER-2 مثبت و سه‌گانه منفی، بیان NKILA به میزان

قابل توجهی پایین‌تر از بیماران دارای زیردسته‌های لومینال A و B بود. این یافته‌ها با مشاهدات بالینی که نشان می‌دهند سرطان‌های HER-2 مثبت و سه‌گانه منفی معمولاً مراحل پیشرفته‌تر، میزان تمایز کمتر و پیش‌آگهی ضعیف‌تری دارند، مطابقت دارند [۲۹،۲۸].

همچنین، کاهش بیان NKILA با افزایش خطر عود و متاستاز مرتبط بود. مقایسه میزان بیان NKILA در بیماران با پیش‌آگهی‌های مختلف نشان داد که کاهش بیان این مولکول با افزایش خطر عود و متاستاز همبستگی دارد. از آن‌جا که ویژگی‌های بالینی سرطان پستان به‌تنهایی قادر به پیش‌بینی دقیق خطر عود و متاستاز پس از جراحی نیستند، سطح بیان NKILA می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی شخصی‌سازی‌شده برای تدوین برنامه‌های درمانی هدفمند مورد استفاده قرار گیرد [۳۰-۳۳].

نتیجه‌گیری

بیان NKILA در ضایعات بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با بافت‌های مجاور و ضایعات بیماری‌های خوش‌خیم، کاهش یافته است. در بیماران مبتلا به عفونت HPV نوع ۱۸/۱۶، سرطان پستان سه‌گانه منفی و همچنین در بیمارانی که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند، این کاهش بیان به‌طور قابل‌توجهی بیشتر است. همچنین، در بیماران با عود و متاستاز پس از جراحی، بیان NKILA در ضایعات به‌شکل قابل‌توجهی کاهش یافته است.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه این است که تنها بیان NKILA در بافت تومور و بافت‌های مجاور بیماران بررسی و مقایسه شده است. در مراحل بعدی، روش‌های تشخیص و بررسی اهمیت بالینی NKILA سرمی به‌طور جامع‌تر مورد بررسی قرار خواهد گرفت تا امکان ارائه ابزارهای تشخیصی زودهنگام، روش‌های درمانی، ارزیابی پیش‌آگهی و حتی توسعه داروهای هدفمند جدید برای سرطان فراهم شود. این امر حساسیت و ویژگی پایین بودن بیان NKILA را در پیش‌بینی خطر عود و متاستاز بیماران مبتلا به سرطان پستان تأیید می‌کند و می‌تواند به‌عنوان یک مبنای عینی جدید برای پیش‌بینی پیش‌آگهی بیماران سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

علاوه بر این، این مطالعه فاقد آزمایش‌های درون‌کشتگاهی و مطالعات حیوانی است و بنابراین نمی‌تواند اثرات بیان NKILA بر تکثیر، مهاجرت و تهاجم سرطان پستان و

عوامل خطر پیشنهادی، مانند چگالی بافت پستان، برای تعیین حساسیت به سرطان پستان نیز ضروری است. با توجه به تنوع در شیوع HPV که در مطالعات قبلی انجام شده در مناطق مختلف جغرافیایی گزارش شده است، بررسی در مناطق جغرافیایی مختلف مورد نیاز است. همچنین، انجام مطالعات چندمرکزی جهانی برای روشن تر کردن نقش احتمالی HPV در سرطان پستان ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از دکتر هانی عقیل و مؤسسه تحقیقات پزشکی عراق (Iraqi Medical Research Center) به خاطر حمایت‌های ارزشمندشان صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله تحت ضوابط کمیته اخلاق مؤسسه تحقیقات پزشکی عراق به شماره ۲۰۱۷-۱۴۲ انجام شده است. هیچ‌گونه تأثیر زیان‌آور بر انسان در این پژوهش محتمل نبوده و در روند درمان بیماران هیچ‌گونه دخالتی صورت نگرفته است.

تأمین مالی

هیچ‌گونه تأمین مالی صورت نگرفته است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان به‌طور مساوی در انجام این پژوهش مشارکت داشته‌اند.

مکانیسم‌های خاص آن را به‌طور دقیق بررسی کند، که این موارد در مطالعات آینده تکمیل خواهد شد.

به‌طور خلاصه، بیان NKILA در ضایعات بیماران مبتلا به سرطان پستان کاهش یافته است. این کاهش بیان در بیماران مبتلا به عفونت HPV نوع ۱۸/۱۶، سرطان پستان سه‌گانه منفی و بیمارانی که پس از جراحی دچار عود و متاستاز شده‌اند، به‌مراتب شدیدتر بوده است. پایین بودن بیان NKILA با عود پس از جراحی در بیماران مرتبط بود. این نتیجه نشان می‌دهد که NKILA ممکن است نقش مهمی در بروز و پیشرفت سرطان پستان ایفا کند و همچنین می‌تواند یک عامل محافظتی در جلوگیری از بروز سرطان در بافت‌های طبیعی باشد.

پیشنهادهای برای تحقیقات آینده

تا جایی که می‌دانیم، این پژوهش نخستین مطالعه‌ای است که به مقایسه شیوع HPV نوع ۱۸/۱۶ در سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC) با سایر زیرگروه‌های سرطان پستان پرداخته و همچنین برای اولین بار هم‌بیانی NF-κB و RNA غیرکدکننده مرتبط با NF-κB را در تمامی زیرگروه‌ها ارزیابی کرده است. اطلاعات موجود درباره عفونت HPV نوع ۱۸/۱۶ محدود است و روش‌های متنوع تشخیص HPV که در مطالعات پیشین استفاده شده‌اند، تعیین فراوانی واقعی HPV در بیماران مبتلا به سرطان پستان را دشوار کرده است.

بنابراین، پیشنهاد می‌شود که این یافته‌ها از طریق چندین مطالعه با نمونه‌های بزرگ‌تر از بیماران مبتلا به سرطان پستان آلوده به HPV نوع ۱۸/۱۶ تأیید شوند. در صورتی که نشانگرهای متعددی به‌عنوان پیش‌بینی‌کننده یا برای استفاده در سطح بالینی معرفی شوند، بررسی اثر سایر

transcriptase activated by E6 oncoprotein is required for human papillomavirus-16/18-infected lung tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*. 2008 ;14(22):7173-9.

4. Zhao RW, Guo ZQ, Zhang RX. Human papillomavirus infection and the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma: a meta-analysis. *Journal of Clinical Virology*. 2016 Jun 1;79:36-43.

References

1. Traves KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment. *Am Fam Physician*. 2021;104(2): 171-8.
2. Khezrian A, Shojaeian A. Role of the Stromal Vascular Fraction in Breast Reconstruction after Breast Cancer Surgery: A Review. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2024;16(4):98-115.
3. Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Chou MC, Ko JL, Lee H. Human telomerase reverse

5. Shaaban SM, Gaber Z, Semary S, Dewidar AM. Impact of Vitamin B12 on outcome of Early Stage Luminal A and B Breast Cancer, single center experience. *Medical and Pharmaceutical Journal*. 2023;2(1):17–27.
6. Milani D, Khorramymehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. The Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) on the Mechanical Properties of Breast Cancer Epithelial Cells. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2023;16(3):95-107.
7. Al-Hussaniy HA, Al-Zobaidy MJ. Effects of Mdm2 Inhibitors on Cellular Viability of Breast Cancer Cell Lines HP100, MCF7. *Bratislavske lekárske listy*. 2024; 125(10): 627-34.
8. Jalil AT, Kadhum WR, Faryad Khan MU, Karevskiy A, Hanan ZK, Suksatan W, et al. RETRACTED ARTICLE: Cancer stages and demographical study of HPV16 in gene L2 isolated from cervical cancer in Dhi-Qar province, Iraq. *Appl Nanosci*. 2021; DOI: 10.1007/s13204-021-01947-9
9. Feng X, Shan R, Hu X. The linkage of NF- κ B signaling pathway-associated long non-coding RNAs with tumor microenvironment and prognosis in cervical cancer. *BMC Med Genomics*. 2023;16(1):169. DOI: 10.1186/s12920-023-01605-9
10. Ahmed MS, Reyadh AR, Shareef BQ, Ali AR, Hany AH, Meena AN. Increasing Prevalence of Congenital Hypothyroidism in children with Down Syndrome who have a family history of Thyroid disease. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2023; 16(3):1327-32.
11. Chen R, Cheng Q, Owusu-Ansah KG, Song G, Jiang D, Zhou L, et al. NKILA, a prognostic indicator, inhibits tumor metastasis by suppressing NF- κ B/Slug mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci*. 2020;16(3):495–503. DOI: 10.7150/ijbs.39582
12. Tibatana MA, Önay Uçar E. Long non-coding RNA NKILA regulates expression of HSP90 α , NF- κ B and β -catenin proteins in the MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Biol Rep*. 2021;48(5):4563–71. DOI: 10.1007/s11033-021-06482-y
13. Al-Hussaniy HA, Alburghaif AH, Alkhafaje Z, Al-Zobaidy MA-HJ, Alkuraishy HM, Mostafa-Hedeab G, et al. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: a new perspective on the role of Digoxin, ATG7 activators, Resveratrol, and herbal drugs. *J Med Life*. 2023;16(4):491–500. DOI: 10.25122/jml-2022-0322
14. Al-Hussaniy H, Al-Tameemi Z, Al-Zubaidi B, Oraibi A, Naji F. Pharmacological properties of *Spirulina* species: Hepatoprotective, antioxidant and anticancer effects. *Farmacia*. 2023;71(4):670–8.
15. Bialecka M, Rac M, Dziedziejko V, Safranow K, Chlubek D, Rać ME. An Evaluation of Plasma TNF, VEGF-A, and IL-6 Determination as a Risk Marker of Atherosclerotic Vascular Damage in Early-Onset CAD Patients. *Journal of Clinical Medicine*. 2024;13(6):1742.
16. Al-Hussaniy HA, Al-Zobaidy MJ. Cytotoxic effect of YH239-EE and its enantiomer on MCF7 cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2024; 25(6): 2133–2138.
17. Jafari E, Zarshenas M, Toosi M, Nematollahi A, Sayadi M. The effect of self-care training programs on lifestyle and breast self-examination of immigrant Afghan women. *J Educ Health Promot*. 2023;12(1):14. DOI: 10.4103/jehp.jehp_332_22
18. Mohsin SF, Al-Drobie B. Human papillomavirus expression in relation to biological behavior, Ki-67 proliferative marker, and P53 prognostic marker in Schneiderian papilloma. *J Med Life*. 2023;16(7):1022–7. DOI:10.25122/jml2022-0312
19. Jihad NA, Naif HM, Sabri EH. Prevalence of high risk human papilloma virus among Iraqi women with abnormal cervical cytology. *Gene Rep*. 2020;21(100871): 100871. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100871
20. Shah UJ, Nasiruddin M, Dar SA, Khan MKA, Akhter MR, Singh N, et al. Emerging biomarkers and clinical significance of HPV genotyping in prevention and management of cervical cancer. *Microb Pathog*. 2020;143(104131):104131. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104131
21. Al-Hussaniy H. The effect of MicroRNA-409-3p for treatment and response to tumor proliferation of lung cancer cell lines (in vitro). *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2022;23.
22. Al-Hussaniy HA, Hassan AF, Oraibi AI, Al-Juhaishi AM, Naji FA, Al-Tameemi ZS. Clinical Pharmacogenetics of Angiotensin II Receptor Blockers in Iraq. *Journal of*

- Pharmacy and Bioallied Sciences. 2023 ;15(3):101-6. DOI:10.4103/jpbs.jpbs_313_23
- 23.Drain AP, Zahir N, Northey JJ, Zhang H, Huang P-J, Maller O, et al. Matrix compliance permits NF-κB activation to drive therapy resistance in breast cancer. *J Exp Med*. 2021;218(5). Available from: DOI:10.1084/jem.20191360
- 24.Taima RK. Idiopathic recurrent pregnancy loss related with GPIa gene in Iraqi patient women. *Medical and Pharmaceutical Journal*. 2023;2(1):65–74.
- 25.Lu Z, Chen Z, Li Y, Wang J, Zhang Z, Che Y, et al. TGF-β-induced NKILA inhibits ESCC cell migration and invasion through NF-κB/MMP14 signaling. *J Mol Med* . 2018;96(3–4):301–13. Available from: DOI: 10.1007/s00109-018-1621-1
- 26.Al-Kuraishy HM, Al-Hussaniy HA, Al-Gareeb AI, Negm WA, El-Kadem AH, Batiha GE-S, et al. Combination of Panax ginseng C. a. mey and febuxostat boasted cardioprotective effects against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Front Pharmacol*. 2022;13:905828. DOI:10.3389/fphar.2022.905828
- 27.Corredor G, Toro P, Koyuncu C, Lu C, Buzzy C, Bera K, et al. An imaging biomarker of tumor-infiltrating lymphocytes to risk-stratify patients with HPV-associated oropharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst* . 2022;114(4):609–17. DOI: 10.1093/jnci/djab215
- 28.Lee HY, Won CR, Luo Y, Lee MH. Human Papillomavirus (HPV) and HPV vaccine awareness among Korean American immigrants in Alabama: Would Internet use improve health awareness? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24(8):2575–81. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.8.2575.
- 29.Alwan NAS, Tawfeeq FN, Muallah FH. Breast cancer subtypes among Iraqi patients: Identified by their ER, PR and HER2 status. *J Fac Med Baghdad*. 2018;59(4):303–7. DOI: 10.32007/jfacmedbagdad.59469
- 30.Abd MA. Association between Serum Insulin and Interleukin-6 levels with Breast Cancer in Post-Menopausal Iraqi Women. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 2023;65(4).
- 31.Mohammed SI, Alkashaf KH. Impact of Clinical Pharmacist Intervention on Chemotherapy Knowledge, Attitude, and Practice among Breast Cancer Womentice among Breast Cancer Women. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 2024;66(1): 103–9.
- 32.Al-Hussaniy HA, Almajidi YQ, Oraibi AI, Alkarawi AH. Nanoemulsions as medicinal components in insoluble medicines. *Pharmacia*. 2023;70(3):537-47.DOI:10.3897/pharmacia.70.e107131
- 33.Kedzia W, Schmidt M, Poreba E, Goździcka-Józefiak A, Kedzia H, Spaczyński M. Diagnosis of papilloma viruses in cervical cancer in 414 women from Wielkopolska region by the immunohistochemical assessment. *Ginekologia polska*. 2005 Jul 1;76(7):548-54.