

VEGF gene expression in papillary thyroid carcinoma and its association with prognostic factors

Zohre Nobahar¹, Mohammadreza Jalali Nadoushan^{2*}

1. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

2. Department of Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Corresponding author e-mail: Jalali@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces proliferation of endothelial cells and angiogenesis. VEGF overexpression has been associated with poor clinical outcome in many malignancies. Also, several studies have reported increased expression of VEGF in papillary thyroid carcinoma. So, present study aimed to evaluate VEGF expression and its association with prognostic markers in papillary thyroid carcinoma.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, totally 80 formalin fixed- paraffin embedded samples from papillary thyroid carcinoma patients referred to Shahid Mostafa Khomeini hospital, Tehran during 2017 to 2021 were immunohistochemically stained by VEGF marker. VEGF expression intensity in tumor cells scored as mild (Less than 25%), moderate (25-50%) and strong (more than 50%). Relation between VEGF expression grade with age, gender, tumor size, capsular invasion and lymph node metastasis was analyzed by SPSS software version 16.

Results: Average of patient's age was 40.56 ± 14.48 years and 58 patients (72.5%) were female. Mild, moderate and severe expression of VEGF was seen in 21.3%, 35% and 43.8% respectively. There was no significant relationship between VEGF expression with age, gender and tumor size. Increased expression of VEGF was significantly associated with increased rate of capsular invasion and lymph node metastasis ($P < 0.001$).

Conclusion: VEGF overexpression is frequently seen in papillary thyroid carcinoma. Increased expression of VEGF is an independent prognostic factor for capsular invasion and lymph node metastasis and could be considered as a poor prognostic and potential therapeutic factor in papillary thyroid carcinoma.

Keywords: Papillary thyroid carcinoma, Angiogenesis, Vascular endothelial growth factor, Prognosis

Received: May 15, 2024

Revised: Jun 18, 2024

Accepted: Jun 22, 2024

How to cite this article: Nobahar Z, Jalali Nadoushan MR. VEGF gene expression in Papillary thyroid carcinoma and its association with prognostic factors. Daneshvar Medicine 2024; 31(2):10-20. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.19070.1497

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بیان ژن VEGF در کارسینوم پاپیلری تیروئید و ارتباط آن با عوامل موثر بر پیش آگهی

زهرة نوبهار^۱، محمدرضا جلالی ندوشن^{۲*}

۱. دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. گروه پاتولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

Email: Jalali@shahed.ac.ir

*نویسنده مسئول: محمدرضا جلالی ندوشن

چکیده

مقدمه و هدف: فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) ارتشاح سلول‌های اندوتلیال و آنژیوژنز را تحریک می‌کند. افزایش بیان VEGF با پیامد بالینی ضعیف در بسیاری از بدخیمی‌ها مرتبط بوده است. چندین مطالعه نیز بیان افزایش یافته‌ی VEGF را در کارسینوم پاپیلری تیروئید گزارش کرده‌اند. لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی بیان VEGF در کارسینوم پاپیلری تیروئید و ارتباط آن با عوامل موثر بر پیش آگهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی، در مجموع ۸۰ نمونه‌ی بلوک پارافینی کارسینوم پاپیلری تیروئید از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید مصطفی خمینی (ره) تهران طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۰ مورد رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با مارکر VEGF قرار گرفتند. شدت بیان VEGF در سلول‌های توموری به صورت خفیف (کمتر از ۲۵٪)، متوسط (۵۰-۲۵٪) و قوی (بیشتر از ۵۰٪) درجه‌بندی شد. ارتباط درجه‌ی بیان VEGF با فاکتورهای سن، جنسیت، اندازه‌ی تومور، تهاجم به کپسول و متاستاز به غدد لنفاوی با SPSS 16 مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

نتایج: میانگین سن بیماران مورد بررسی $40/56 \pm 14/48$ سال و ۵۸ بیمار (۷۲/۵٪) زن بودند. بیان خفیف، متوسط و قوی VEGF به ترتیب در ۲۱/۳٪، ۳۵٪ و ۴۳/۸٪ نمونه‌ها مشاهده شد. ارتباط آماری معنی‌داری بین بیان VEGF با سن، جنسیت و اندازه‌ی تومور وجود نداشت. افزایش بیان VEGF به طور معنی‌داری با فراوانی بالاتر تهاجم به کپسول و متاستاز غدد لنفاوی مرتبط بود ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: افزایش بیان VEGF به طور شایع در کارسینوم پاپیلری تیروئید مشاهده می‌شود. بیان افزایش‌یافته‌ی VEGF یک فاکتور خطر مستقل برای تهاجم به کپسول و متاستاز به غدد لنفاوی بوده و می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش آگهی منفی و همچنین یک فاکتور بالقوه‌ی درمانی در کارسینوم پاپیلری تیروئید مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: کارسینوم پاپیلری تیروئید، آنژیوژنز، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، پیش آگهی

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۲/۲۶

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲

مقدمه

غیرطبیعی هستند. رگ‌های خونی معمولاً نامنظم و ماریچی و دارای نشت و خونریزی هستند که منجر به افزایش فشار بینابینی می‌شود. این ویژگی‌ها به این معنی است که جریان خون تومور کمتر از حد مطلوب است که منجر به هایپوکسی و تولید بیشتر VEGF می‌گردد. این نقش مرکزی VEGF در تولید عروق تومور آن را به یک هدف منطقی برای درمان ضد سرطان تبدیل می‌کند (۸، ۷).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که فرایند آنژیوژنز منجر به رشد تومور می‌گردد و در نهایت منجر به متاستاز تومور به سایر نقاط می‌شود. در نتیجه، این فاکتور مطرح‌کننده‌ی افزایش خطر پیشرفت تومور و پیش‌بینی کننده‌ی نتیجه‌ی بیماری است (۳). در یک مطالعه، فاکتور VEGF-C به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی منفی در بیماران مبتلا به کارسینوم پاپیلری تیروئید معرفی شده است (۶).

کارسینوم پاپیلری تیروئید شایع‌ترین بدخیمی تیروئید در سراسر جهان است که ۸۰-۷۰٪ موارد تومورهای بدخیم تیروئید و حدود ۱٪ از همه‌ی بدخیمی‌ها را شامل می‌شود (۱۱). برخلاف بروز بالا اما مرگ ناشی از کارسینوم پاپیلری تیروئید نادر است و اغلب بیماران به جراحی و درمان هدفمند با ید رادیواکتیو جواب می‌دهند (۱۲). چندین فاکتور با ایجاد و گسترش این نئوپلاسم مرتبط می‌باشند که شامل تغییرات ژنتیکی، فاکتور رشد و رادیاسیون می‌باشد (۱۳). سندروم‌های ژنتیکی مختلفی بیماران را مستعد ابتلا به کارسینوم پاپیلری تیروئید می‌سازد. بیماران مبتلا به پولیپوز آدنوماتوس فامیلی کولون، معمولاً کارسینوم‌های پاپیلری تیروئید با ویژگی‌های مورفولوژیک متمایزی را نشان می‌دهند (۱۴). در سندروم کودن^۳ نیز بیماران به طور شایع مبتلا به ضایعات فولیکولی تیروئید می‌شوند (۱۵).

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی از طریق ایجاد عروق خونی جدید یک نقش حیاتی در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از

در سال‌های اخیر، شیوع سرطان تیروئید در بین سایر بدخیمی‌ها روند افزایشی چشمگیری داشته است (۱). سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی غدد درون‌ریز می‌باشد که شیوع آن در جهان در حال افزایش است. بر اساس آمار ثبت شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در کشور ما نیز سرطان تیروئید یکی از ۱۰ سرطان شایع در میان زنان است که میزان بروز آن در زنان و مردان به ترتیب ۴/۳۶٪ و ۱/۱۹٪ می‌باشد (۲). کارسینوم پاپیلری تیروئید^۱ شایع‌ترین زیرگروه سرطان تیروئید است که بیش از ۸۰٪ موارد را تشکیل می‌دهد (۳). کارسینوم پاپیلری در بین سایر بدخیمی‌های غده‌ی تیروئید، پیش‌آگهی بهتری دارد و در صورتی که به موقع تشخیص داده شده و درمان شود اغلب بیماران بقای ۱۰ ساله را تجربه می‌کنند (۴). پیش‌آگهی کارسینوم پاپیلری تیروئید به فاکتورهای متعددی بستگی دارد که برخی از آنها شامل اندازه‌ی تومور، سن و جنسیت بیمار، تهاجم به کپسول تیروئید و همچنین متاستاز به غدد لنفاوی می‌باشد (۵).

یکی از فرایندهای اساسی برای پیشرفت تومور، رگ‌زایی و لنفانژیوژنز می‌باشد (۳). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی^۲ (VEGF) یک سایتوکین است که باعث رشد عروق خونی و لنفاوی می‌شود و در نتیجه، رگ‌زایی را تحریک می‌کند (۶). VEGF یک واسطه‌ی کلیدی رگ‌زایی در سرطان است که موارد مختلفی مانند بیان اونکوژن‌ها، انواع فاکتورهای رشد و هایپوکسی در تنظیم آن نقش دارند. آنژیوژنز برای رشد تومور ضروری است. قبل از این که تومور بتواند بیش از ۱ تا ۲ میلی‌متر رشد نماید، به رگ‌های خونی برای تامین مواد مغذی و اکسیژن نیاز دارد. تولید VEGF و سایر فاکتورهای رشد توسط تومور منجر به ایجاد عروق جدید در داخل و اطراف تومور و رشد فزاینده تومور می‌گردد (۷). عروق توموری که تحت تاثیر VEGF تشکیل می‌شوند از نظر ساختاری و عملکردی،

1. Papillary thyroid carcinoma
2. Vascular endothelial growth factor

این بیمارستان تحت جراحی تیروئیدکتومی توتال قرار گرفته بودند، و نمونه کافی بدون نکروز و خونریزی در دسترس بود شناسایی شدند. سپس لام‌های رنگ‌آمیزی شده با روش H&E و بلوک‌های پارافینی این نمونه‌ها از بایگانی بخش پاتولوژی استخراج شد. لام‌های استخراج شده توسط یک پاتولوژیست مورد بازبینی قرار گرفته و فاکتورهای هیستوپاتولوژیک مانند تهاجم به کپسول تیروئید و گسترش خارج تیروئیدی و درگیری غدد لنفاوی برای هر نمونه تعیین شد. همچنین اطلاعات بالینی شامل سن و جنسیت بیماران و اندازه‌ی تومور نیز از پرونده‌ی بالینی بیماران استخراج شد. در نهایت بلوک پارافینی مناسب جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی که دارای سلول‌های توموری کافی و حداقل نکروز و خونریزی بود انتخاب و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به شرح زیر انجام شد.

ابتدا از هر بلوک پارافینی فیکس شده در فرمالین، یک برش ۴ میکرونی با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه شد. رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی برپایه‌ی دستورالعمل رنگ‌آمیزی کیت آزمایشگاهی VEGF انجام شد. بر اساس دستورالعمل کیت، ابتدا برش‌های بافتی برای مدت چند ثانیه در محلول آب و الکل و نیز حمام آب گرم غوطه‌ور شده و بر روی اسلاید گذاشته شد. سپس لام حاصل در فور به مدت یک ساعت در درجه حرارت ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و توسط محلول گزینول دیپارافینه شد. سپس مرحله‌ی آبدهی مجدد با قرار دادن نمونه‌ها در سه ظرف الکل به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰، ۹۶ و ۷۰٪ و در هر ظرف به مدت ۵ دقیقه انجام شد تا بافت جهت رنگ‌آمیزی آماده شود. سپس لام‌ها با سالین بافر شده‌ی تریس^۱ (TBS) با pH=7.4 شسته شدند. در مرحله بعد، لام در محلول پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ برای ۱۰ دقیقه غوطه‌ور گردید تا عملکرد پروکسیدازهای درونی متوقف گردد. سپس برای بازیابی آنتی‌ژن^۲، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سیترات ۱۰ میکرومولار بر لیتر با pH=6 در اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شست‌وشوی لام‌ها با بافر TBS دو قطره از محلول بلوک پراکسیداز^۳ به

جمله محدودده‌ی وسیعی از سرطان‌های انسانی دارد. از نظر بالینی افزایش بیان VEGF در بسیاری از انواع تومورهای مختلف انسانی شامل سرطان‌های کولورکتال، معده، سرویکس و پستان مشاهده شده است (۲۰،۲۱). مطالعات اخیر همچنین افزایش بیان VEGF در سرطان‌های تیروئید را نشان داده‌اند (۹،۲۲). سطوح بالاتر VEGF mRNA در کارسینوم پاپیلری تیروئید بر خلاف کارسینوم فولیکولر با استفاده از روش‌های هیبریدیزاسیون درجا و PCR شناسایی شده است (۱۷،۲۳). با توجه به نقش VEGF به عنوان یک فاکتور کلیدی در سوئیچ آنژیوژنیک و ایجاد عروق خونی جدید درون تومور، بروز بالاتر متاستاز غدد لنفاوی در کارسینوم پاپیلری در مقایسه با سایر تومورهای توپر تیروئید می‌تواند مرتبط با افزایش بیان VEGF در این تومورها باشد. به هر حال ارتباط بیان VEGF با فاکتورهای مرتبط با پیش‌آگهی کارسینوم پاپیلری تیروئید در مطالعات قبلی به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته و در مطالعات انجام شده نیز نتایج متفاوتی به دست آمده است. لذا با توجه به عدم انجام مطالعه‌ی با این موضوع در کشور ما، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی بیان ژن VEGF در کارسینوم پاپیلری تیروئید و ارتباط آن با پیش‌آگهی بیماران انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی گذشته‌نگر و دارای جنبه‌های توصیفی و تحلیلی بود و تعداد ۸۰ نمونه‌های بافتی مربوط به کلیه‌ی بیمارانی بود که با تشخیص کارسینوم پاپیلری تیروئید طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۰ در بیمارستان شهید مصطفی خمینی (ره) تهران تحت جراحی تیروئیدکتومی توتال قرار گرفته بودند و بلوک پارافینی آن‌ها دارای بافت کافی و در دسترس برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بود. نمونه‌های فاقد بافت کافی برای انجام رنگ‌آمیزی یا نمونه‌هایی که پرونده‌ی آن‌ها ناقص بود از مطالعه خارج شدند.

برای انجام این مطالعه تمامی بیمارانی که با تشخیص کارسینوم پاپیلری تیروئید طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۰ در

1. Tris-buffered saline
2. Antigen retrieval
3. Serum blocking

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی ارتباط آماری بین وضعیت بیان VEGF با فاکتورهای پاتولوژیک موثر بر پیش‌آگهی و همچنین فاکتورهای دموگرافیک جنسیت و سن بیماران از آزمون‌های آماری کای اسکوئر و آتوای یک‌طرفه برای بررسی این ارتباط استفاده شد. معیار معنی‌داری آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه در مجموع ۸۰ نمونه‌ی کارسینوم پاپیلری تیروئید شامل ۵۸ بیمار زن (۷۲/۵٪) و ۲۲ بیمار مرد (۲۷/۵٪) مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن بیماران مورد بررسی $48/14 \pm 56/40$ سال با میانگین ۳۹ سال و در محدوده‌ی ۱۴ تا ۸۰ سال بود. همچنین میانگین اندازه‌ی تومور در نمونه‌های مورد بررسی $23/2 \pm 46/3$ سانتی‌متر با میانگین ۳ سانتی‌متر و در محدوده‌ی ۰/۵ تا ۱۴ سانتی‌متر بود. فراوانی تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی در نمونه‌های مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است. بر این اساس، تهاجم به کپسول تومور و درگیری غدد لنفاوی ناحیه‌ای با تومور به ترتیب در ۵۲/۵٪ و ۳۶/۳٪ نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد.

منظور کاهش رنگ‌آمیزی غیراختصاصی زمینه، روی لام‌ها ریخته و بعد از ۵ دقیقه دو بار لام‌ها با بافر TBS و هر بار به مدت ۵ دقیقه، شست‌وشو داده شدند. این اعمال جهت حذف آنتی‌بادی‌های اضافی صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد آنتی‌بادی مونوکلونال ضد VEGF (Biogenex, USA) به مدت ۶۰ دقیقه روی لام‌ها قرار داده شد. بعد از این زمان، سطح لام‌ها با بافر TBS شست‌وشو داده شدند. پس از شست‌وشو، لام‌ها با آنزیم پروکسیداز تربچه‌ی کوهی^۱ (HRP) ضد خرگوش انکوبه شده و در مرحله‌ی ایجاد کنتراست، ۲ قطره از محلول هماتوکسیلین به لام‌ها اضافه گردید و پس از ۱ تا ۳ دقیقه با آب معمولی شسته شدند و سپس در محلول‌های متانول، آبگیری نمونه انجام شد. لام برای ۳۰ ثانیه در محلول TBS گذاشته شدند. پس از شفاف‌سازی لام توسط محلول گزبلین، از محلول Histomount ۲ قطره به لام‌ها اضافه و بر روی هر لام، لامل گذاشته شد. نمونه‌ی جفت به عنوان کنترل مثبت و حذف آنتی‌بادی اولیه بر روی نمونه‌های مورد مطالعه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

در نهایت لام‌های رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی توسط یک پاتولوژیست با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. با شمارش حداقل ۱۰۰۰ سلول توموری در پرسلول‌ترین منطقه‌ی بدون نکروز و خونریزی در بزرگ‌نمایی 400x، تعداد سلول‌های توموری که رنگ‌آمیزی قطعی با VEGF را نشان دادند شمارش شده و درصد آن‌ها در کل سلول‌های شمارش شده تعیین شد. بر اساس درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده در کل تومور، نمونه‌های دارای رنگ‌آمیزی مثبت به ۳ درجه‌ی رنگ‌آمیزی خفیف (۰-۲۵٪)، متوسط (۲۵-۵۰٪) و شدید (بیشتر از ۵۰٪) تقسیم شدند (۲۴).

اطلاعات جمع‌آوری شده وارد نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. اطلاعات توصیفی کیفی به صورت درصد فراوانی و اطلاعات کمی به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان گردید.

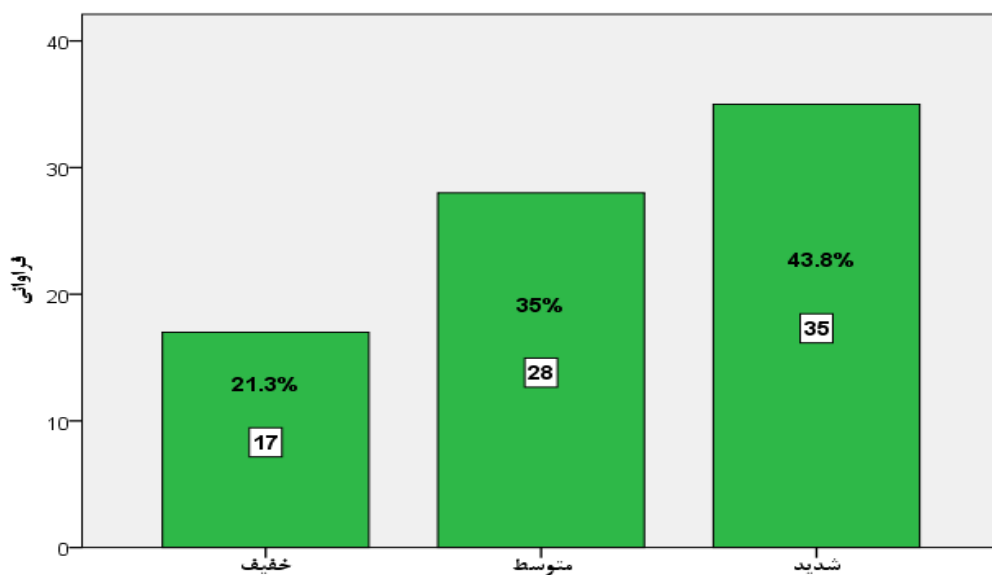
1. Horseradish peroxidase

جدول ۱. فراوانی تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی در نمونه‌های مورد بررسی

متغیر	مثبت	منفی	فراوانی
تهاجم به کپسول	مثبت	منفی	۴۲ (۵۲٪/۵)
	منفی	مثبت	۳۸ (۴۷٪/۵)
درگیری غدد لنفاوی	مثبت	منفی	۲۹ (۳۶٪/۳)
	منفی	مثبت	۵۱ (۶۳٪/۷)

۸۶٪ بود. فراوانی وضعیت بیان VEGF در نمونه‌های مورد بررسی در نمودار ۱ نشان داده شده است.

میانگین درصد بیان VEGF در سلول‌های توموری در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید مورد بررسی ۲۰/۵ ± ۴۴/۹۲ درصد با میانه‌ی ۴۵/۵٪ و در محدوده‌ی ۵٪ تا



نمودار ۱. فراوانی وضعیت بیان VEGF در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید

شامل جنسیت بیمار، تهاجم به کپسول تومور و درگیری غدد لنفاوی ناحیه‌ای در جدول ۲ نشان داده شده است.

ارتباط بین وضعیت بیان VEGF در سلول‌های توموری در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید با متغیرهای کیفی

جدول ۲. ارتباط وضعیت بیان VEGF با متغیرهای زمینه‌ای کیفی

P value	وضعیت بیان VEGF			متغیر	
	شدید	متوسط	خفیف		
۰/۱۴۷	۱۳ (۵۹/۱)	۷ (۳۱/۸)	۲ (۹/۱)	مرد	جنسیت
	۲۲ (۳۷/۹)	۲۱ (۳۶/۲)	۱۵ (۲۵/۹)	زن	
۰/۰۰۱>	۳۲ (۷۶/۲)	۹ (۲۱/۴)	۱ (۲/۴)	مثبت	تهاجم به کپسول
	۳ (۷/۹)	۱۹ (۵۰٪)	۱۶ (۴۲/۱)	منفی	
۰/۰۰۱>	۲۰ (۶۹٪)	۹ (۳۱٪)	۰	مثبت	درگیری غدد لنفاوی
	۱۵ (۲۹/۴)	۱۹ (۳۷/۳)	۱۷ (۳۳/۳)	منفی	

سن دارای توزیع آماری نرمال و متغیر اندازه‌ی تومور دارای توزیع غیرنرمال می‌باشد. لذا جهت بررسی ارتباط بیان VEGF با سن بیماران از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه و برای بررسی ارتباط آن با اندازه‌ی تومور از آزمون آماری غیرپارامتریک کروسکال-والیس استفاده شد. نتایج به دست آمده از این بررسی در جدول ۳ نشان داده شده است. بر این اساس مشخص شد ارتباط آماری معنی‌داری بین وضعیت بیان VEGF در سلول‌های توموری کارسینوم پاپیلری تیروئید با سن بیماران و اندازه‌ی تومور در نمونه‌های مورد بررسی وجود نداشت.

بر اساس این یافته‌ها، ارتباط آماری معنی‌داری بین بیان VEGF با متغیرهای تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی در کارسینوم پاپیلری تیروئید وجود داشت. به طوری که بیان بالاتر VEGF در سلول‌های توموری با تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی ناحیه‌ای مرتبط بود.

برای بررسی ارتباط بین بیان ایمونوهیستوشیمی VEGF در سلول‌های توموری با متغیرهای کمی شامل سن بیماران و اندازه‌ی تومور، ابتدا وضعیت توزیع آماری این متغیرها با استفاده از آزمون آماری کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت که بر این اساس مشخص شد، متغیر

جدول ۳. ارتباط وضعیت بیان VEGF با متغیرهای زمینه‌ای کمی

P value	وضعیت بیان VEGF			متغیر
	شدید	متوسط	خفیف	
۰/۴۴۴	۴۲/۸ ± ۱۵/۲۴	۳۹/۵ ± ۱۳/۸۳	۳۷/۷ ± ۱۴/۰۳	میانگین سن بیماران (سال)
۰/۷۹۶	۳/۲۷ ± ۲/۰۳	۳/۶۵ ± ۲/۶۴	۳/۵۴ ± ۱/۹۸	میانگین اندازه‌ی تومور (سانتی‌متر)

فاکتور خطر مستقل برای تهاجم به کپسول بود اما ارتباطی با درگیری غدد لنفاوی نداشت. متغیرهای سن و جنس نیز با هیچ‌یک از فاکتورهای تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی ارتباط نداشتند. اطلاعات مربوط به آنالیز چند متغیره در جدول ۴ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج آنالیز چند متغیره جهت شناسایی متغیرهای دارای ارتباط مستقل با تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی در کارسینوم پاپیلری تیروئید مشخص شد که بیان بالای VEGF یک فاکتور خطر مستقل برای تهاجم به کپسول و درگیری غدد لنفاوی در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید می‌باشد. همچنین اندازه‌ی تومور یک

جدول ۴. آنالیز چندمتغیره فاکتورهای موثر بر درگیری غدد لنفاوی و تهاجم به کپسول

تهاجم به کپسول		درگیری غدد لنفاوی		متغیر
F	P value	F	P value	
۰/۰۲۰	۰/۸۸۸	۰/۶۷۸	۰/۴۱۳	جنسیت
۵/۲۴۱	۰/۰۲۵	۰/۱۲۳	۰/۷۲۷	اندازه‌ی تومور
۶۸/۹۷	۰/۰۰۱۶	۱۷/۸۴	۰/۰۰۱۶	بیان VEGF
۰	۰/۹۹۸	۰/۶۹۸	۰/۴۰۶	سن

بحث

تمام نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید مشاهده شد. همچنین ۴۳/۸٪ نمونه‌ها دارای بیان شدید این مارکر بودند و بیان متوسط در ۳۵٪ نمونه‌ها و بیان ضعیف نیز در ۲۱/۳٪ نمونه‌ها مشاهده شد. بیان افزایش‌یافته‌ی VEGF

در مطالعه‌ی حاضر وضعیت بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، بیان VEGF در

عروق خونی جدید شده که در فرایند پیشرفت و رشد تومور نقش دارد.

یافته‌های مطالعه‌ی ما در مورد ارتباط بین شدت بیان ایمونوهیستوشیمی VEGF با فاکتورهای مرتبط با پیش‌آگهی کارسینوم پاپیلری تیروئید نشان داد که بیان شدیدتر مارکر VEGF در سلول‌های توموری کارسینوم پاپیلری با فراوانی بالاتر درگیری غدد لنفاوی و همچنین تهاجم به کپسول تومور مرتبط است که این یافته در آنالیز چند متغیره نیز مورد تایید قرار گرفت. در مطالعه‌ای که کلین و همکارانش در کشور فرانسه انجام دادند، متوسط نمره‌ی بیان VEGF در کارسینوم‌های متاستاتیک به غدد لنفاوی به‌طور معنی‌داری بیشتر از کارسینوم‌های غیرمتاستاتیک بود (۱۹). در مطالعه‌ی لنارد و همکاران نیز رنگ‌آمیزی منتشر و شدید VEGF در نمونه‌های دارای متاستاز دوردست، عود موضعی و عود دوردست به‌طور معنی‌داری بیشتر از شدت رنگ‌آمیزی ضعیف و غیرمنتشر بود (۲۵). در مطالعه‌ی یو و همکاران، بیان افزایش‌یافته‌ی پروتئین VEGF-C در کارسینوم پاپیلری تیروئید با متاستاز غدد لنفاوی و تهاجم عروقی-لنفاوی مرتبط اما مستقل از سایر متغیرهای بالینی و پاتولوژیک بود (۲۶). سریچ و همکارانش نشان دادند که یک ارتباط معنی‌دار بین تهاجم به مارژین جراحی و گسترش خارج تیروئیدی با بیان VEGF-C در کارسینوم پاپیلری تیروئید وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی پیش‌آگهی ضعیف‌تر بیماری است. در نهایت این مطالعه، بیان VEGF-C را به عنوان یک فاکتور موثر بر پیش‌آگهی منفی در بیماران مبتلا به کارسینوم پاپیلری تیروئید نشان داد (۶). این در حالی است که در مطالعه‌ی رازی و همکاران که در سال ۲۰۱۹ در کشور مالزی منتشر شد، ارتباط آماری معنی‌داری بین وضعیت غدد لنفاوی و گسترش خارج تیروئیدی با سن بیمار، جنسیت و بیان VEGF و VEGFR مشاهده نشد (۱۸). در مجموع تقریباً تمام مطالعات انجام شده در این زمینه همراستا با مطالعه‌ی ما یک ارتباط معنی‌دار را بین شدت بالاتر بیان VEGF با فاکتورهای پیش‌آگهی نامطلوب به ویژه متاستاز به غدد لنفاوی در کارسینوم پاپیلری تیروئید نشان دادند. بیان افزایش‌یافته‌ی VEGF به وسیله‌ی بدخیمی‌ها با پیامد بالینی ضعیف‌تر یا خطر افزایش‌یافته

در کارسینوم پاپیلری تیروئید در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است. نخستین بار کاتوج و همکارانش در سال ۱۹۹۹ با استفاده از روش هیبریدیزاسیون درجا، یک بیان قوی VEGF در سلول‌های توموری پوشاننده‌ی پاپیلاهای نئوپلاستیک را در نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید نشان دادند (۱۶). در مطالعه‌ی لنارد و همکاران در کشور آمریکا نیز بیان VEGF در ۹۸٪ نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید مشاهده شد که دارای شدت کم تا متوسط در اغلب سلول‌های بدخیم بود (۲۵). در مطالعه‌ای که یو و همکارانش در کشور هنگ‌کنگ انجام دادند، افزایش بیان VEGF-C در ۶۹٪ نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید و ۵٪ نمونه‌های ندول تیروئیدی خوش‌خیم در مقایسه با بافت تیروئید نرمال مشاهده شد (۲۶). همچنین جبریل^۱ و همکارانش بیان ایمنی VEGF را در تمام نمونه‌های کارسینوم پاپیلری و ۹۴٪ نمونه‌های گواتر مولتی‌ندولر تیروئید نشان دادند که شدت آن در مقایسه با سلول‌های تیروئیدی نرمال بیشتر بود (۲۷). VEGF یک فاکتور آنژیوژنیک توموری است که به وسیله‌ی سلول‌های نئوپلاستیک تولید شده و در فرایند ایجاد عروق خونی جدید نقش دارد. VEGF همچنین ممکن است در تنظیم شکل‌گیری و عملکرد سلول‌های اپیتلیال تیروئیدی و همچنین پیشرفت تومورهای تیروئید از یک فاز پیش عروقی به یک فاز عروقی نقش بازی می‌کند. بیان VEGF در سلول‌های توموری سرطان تیروئید می‌تواند ایجاد عروق جدید را القا کند (۲۸). یک مطالعه نشان داد که بیان افزایش‌یافته‌ی VEGF mRNA در سرطان‌های تیروئید با قابلیت تومورزایی بالا مرتبط است و می‌تواند یک رویداد مهم در تغییر تومورهای گرید پایین به گرید بالا باشد (۲۹). با توجه به این که پیشرفت کارسینوم تیروئید یک فرایند وابسته به آنژیوژنز است (۳۰). بنابراین بیان VEGF مشاهده شده در سلول‌های توموری در مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، دارای یک نقش احتمالی در فرایند پیشرفت کارسینوم پاپیلری تیروئید می‌باشد. در حقیقت به نظر می‌رسد که سلول‌های توموری کارسینوم پاپیلری تیروئید با تولید VEGF منجر به ایجاد

مبتلا به کارسینوم پاپیلری تیروئید افزایش می‌دهد. یک مطالعه، همبستگی بین سطوح بالاتر VEGF و ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (MMP-9) را با گسترش لنفاتیک و تهاجم موضعی در کارسینوم پاپیلری تیروئید نشان داد که مطرح‌کننده‌ی ارزش بالقوه‌ی آن به عنوان یک بیومارکر پیشگویی‌کننده‌ی تهاجم موضعی در این بیماران است (۳۵). علی‌رغم ارتباط گزارش شده بین بیان VEGF با برخی فاکتورهای موثر بر پیش‌آگهی کارسینوم پاپیلری تیروئید به ویژه متاستاز به غدد لنفاوی، اما ارتباط بیان این مارکر با بقای دراز مدت و عود بیماری در این بیماران کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ی لنارد و همکاران، الگوی منتشر و شدید بیان VEGF با یک بقای بدون عود کوتاه‌تر نسبت به دیگر الگوهای رنگ‌آمیزی همراه بود (۲۵). در مطالعه‌ی سریچ و همکاران نیز پیک همبستگی خطی معنی‌دار بین اندازه‌ی تومور، بیان VEGF-C و عود بیماری وجود داشت (۶). در مطالعه‌ی کاپ و همکاران که در نمونه‌های کارسینوم مدولری تیروئید انجام شد، پس از یک پیگیری متوسط ۵ ساله، ارتباطی بین بیان VEGF با پیامد بیماری مشاهده نشد (۱۰). با توجه به عدم پیگیری بیماران و عدم بررسی متاستاز در این مطالعه و با توجه به تعداد کم مطالعات انجام شده در این زمینه، نیاز به انجام مطالعات بیشتر با پیگیری درازمدت در این بیماران می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، بیان VEGF در تمام نمونه‌های کارسینوم پاپیلری تیروئید دیده می‌شود و بیان ایمونوهیستوشیمی قوی‌تر VEGF در سلول‌های توموری کارسینوم پاپیلری تیروئید با افزایش خطر تهاجم به کپسول و متاستاز به غدد لنفاوی همراه است اما با سن و جنسیت بیماران و اندازه‌ی تومور ارتباطی ندارد. بیان VEGF یک فاکتور خطر مستقل برای تهاجم به کپسول و متاستاز به غدد لنفاوی بوده و می‌تواند به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی منفی و همچنین یک فاکتور بالقوه‌ی درمانی در کارسینوم پاپیلری تیروئید مطرح باشد. به هر حال انجام مطالعات بیشتری برای نتیجه‌گیری قطعی در این زمینه مورد نیاز است.

برای عود یا متاستاز در سرطان‌های مختلف مانند کارسینوم پستان، سرطان تخمدان و اندومتر، کارسینوم معده و کولون، ملانوم یا سرطان‌های سر و گردن همراه بوده است (۳۳-۳۱). ارتباط بین بیان قوی VEGF با تهاجم عروقی در تومورهای تیروئید در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۳). در حقیقت به نظر می‌رسد فاکتور VEGF با افزایش ایجاد عروق خونی و لنفاوی کوچک جدید علاوه بر کمک به رشد تومور سبب افزایش خطر تهاجم به عروق خونی و لنفاوی و در نهایت متاستاز به غدد لنفاوی می‌گردد. توانایی بیان قوی VEGF در پیش‌بینی متاستاز غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به کارسینوم پاپیلری تیروئید ممکن است، شناسایی بیماران مبتلا به متاستازهای مخفی غدد لنفاوی را در این بیماران تسهیل کرده و مدیریت بالینی آن‌ها را ارتقا بخشد. به هر حال مطالعات بیشتری برای ارزیابی نقش و کاربرد بالینی آن لازم است.

بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی ما ارتباط آماری معنی‌داری بین اندازه‌ی تومور و سن و جنسیت بیماران با بیان VEGF در سلول‌های توموری کارسینوم پاپیلری تیروئید وجود نداشت اما اندازه‌ی تومور و بیان VEGF هر دو یک فاکتور خطر مستقل برای تهاجم به کپسول تومور بودند که بیان VEGF دارای ارتباط بسیار قوی‌تری بود. بر اساس نتایج مطالعه‌ی سریچ و همکاران، یک همبستگی خطی معنی‌دار بین اندازه‌ی تومور، بیان VEGF-C و عود بیماری وجود داشت (۶). برخی مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که بیان VEGF mRNA در تومورهای دارای اندازه‌ی کوچک‌تر افزایش می‌یابد اما پروتئین VEGF در مراحل پیشرفته‌تر کارسینوم پاپیلری تیروئید دچار افزایش بیان می‌شود (۳۴). در مطالعه‌ی اسکولتچ و همکاران، افزایش بیان VEGF با افزایش اندازه‌ی تومور تنها در بیماران مسن‌تر از ۵۰ سال همراهی داشت (۳). در مطالعه‌ی Yu و همکاران در کشور هنگ‌کنگ نیز مانند مطالعه‌ی حاضر، ارتباط آماری معنی‌داری بین بیان VEGF با سن، جنسیت و اندازه‌ی تومور وجود نداشت (۲۶). بنابراین بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر و برخی مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که بیان بالاتر VEGF به طور مستقل از سن و جنسیت بیماران و اندازه‌ی تومور خطر تهاجم به کپسول و متاستاز به غدد لنفاوی را در بیماران

ملاحظات اخلاقی

مطالعه‌ی حاضر با کد اخلاق IR.SHAHED.REC.1401.149 در کمیته اخلاق طرح‌های پژوهشی دانشگاه شاهد تصویب شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی مقطع دکترای حرفه‌ای دانشگاه شاهد است و بدین‌وسیله از تمامی اشخاصی که صمیمانه در اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، قدردانی می‌کنیم.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Abbas Zadeh M, Tangestani A, Jokar N, Rowan Bod M R, Hormazi Sheriff M R. Determination of prognostic factors in the survival of patients with differentiated thyroid cancer. *Tebe Jounob Journal* 2019; 23(3): 248-56.
2. Jalali Nadushan M R, Sarmastzadeh T, Devati A. Comparison of BAX expression in papillary carcinoma and papillary thyroid microcarcinoma and its relationship with factors affecting prognosis. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Science* 2016. 22(1): 9-43.
3. Skuletic V, Radosavljevic GD, Pantic J, Markovic BS, Jovanovic I, Jankovic N, et al. Angiogenic and lymphangiogenic profiles in histological variants of papillary thyroid carcinoma. *Polish Archives of Internal Medicine* 2017; 127(6): 429-37.
4. Badkobe Hazare Z, Jalali Nadushan Moh R, Azizzadeh Delshad A. CD117 expression in multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma and its relationship with factors affecting prognosis. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2019; 30 (192): 133-8.
5. Esfandiari K, Jalali Nadushan M R, Heshmati M, Miri Seyed R. Expression of cytokeratin 7 in papillary thyroid carcinoma and its relationship with factors affecting prognosis. *Daneshvar Med* 1400; 29(2): 91-9.
6. Ceric S, Ceric T, Pojskic N, Bilalovic N, Musanovic J, Kucukalic- Selimovic E. Immunohistochemical expression and prognostic significance of VEGF-C in well-differentiated thyroid cancer. *Acta Endocrinologica* 2020; 16(4): 409-16.
7. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69(3): 4-10.
8. Apta RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell* 2019; 176: 1248-64.
9. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *The American Journal of Pathology* 1999; 155: 1967-76.
10. Capp C, Magagnin Wagner S, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Luiza Maia A. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2010; 20(8): 863071.
11. Gonzalez R, Bologna-Molina R, Carreon-Burciaga RG, Gastelum M, Molina-Frechero N, Rodriguez SS. Papillary Thyroid Carcinoma: Differential diagnosis and prognostic values of its different variants: Review of the Literature. *International Scholarly Research Notices Oncology* 2011; 12: 122-8.
12. Al-Brahim N. Papillary thyroid carcinoma: An overview. *he Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2006; 130:1057-106.
13. Erdem H, Gundogdu Cemal C, Uipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology* 2011; 90(3): 312-17.
14. LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL. Papillary carcinoma. In: De Lellis, Lloyd R, Heitz PU, Eng C, eds. *Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004: 57-66.
15. Ito Y, Kudo T, Kobayashi K, Miya A, Ichihara K, Miyauchi A. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung, and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up. *World Journal of Surgery* 2012; 36: 1274-8.
16. Katoh R, Miyagi E, Kawaoi A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid neoplasms. *Human Pathology* 1999; 30: 891-7.

17. Fellmer PT, Sato K, Tanaka R. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery* 1999; 126: 1056-61.
18. Razy NH, Abdul Rahman WF, Win TT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in thyroid nodular hyperplasia and papillary thyroid carcinoma: A tertiary health care center based study. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2019; 20(1): 277-82.
19. Klein M, Picard E, Vignaud JM. Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *Journal of Endocrinology* 1999; 161: 41-9.
20. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor- C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *British Journal of Cancer* 2000; 83: 887-91.
21. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 1999; 90: 977-81.
22. Shushanov S, Bronstein M, Adelaide J. VEGF_C and VEGFR3 expression in human thyroid pathologies. *International Journal of Cancer* 2000; 86: 47-52.
23. Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, Kanauchi H, Wong MG, Kebebew E. Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88: 3694-9.
24. Kadivar Maryam, Esmaili Ali, Julaei Azadeh. Investigating the density of small vessels and vascular endothelial growth factor in invasive breast carcinomas by immunohistochemical marker method and comparing it with clinicopathological parameters. *Iranian Journal of Medical Sciences* 1388; 16(69): 55-46.
25. Lennard CM, Patel A, Wilson J. Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2001; 129: 552-8.
26. Yu XM, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Leung P, Luk JM. Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(22): 8063-9.
27. Jebreel A, England J, Bedford K. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *International Journal of Experimental Pathology* 2007; 88: 271-7.
28. Gulubova M, Ivanova K, Ananiev J. VEGF expression, microvessel density and dendritic cell decrease in thyroid cancer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2014; 228: 508-17.
29. Shaha A. Treatment of thyroid cancer based on risk groups. *Journal of Surgical Oncology* 2006; 94: 683-91.
30. Ji B, Liu Y, Zhang P, et al. COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *International Journal of Medicine Sciences* 2012; 9: 237-42.
31. Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 2001; 78: 132-7.
32. Hirai M, Nakagawara A, Oosaki T, Hayashi Y, Hirono M, Yoshihara T. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C/VEGF- 2) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2001; 80: 181-8.
33. Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2003; 64: 61-73.
34. Salajegheh A, Pakneshan S, Rahman A. Co-regulatory potential of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C in thyroid carcinoma. *Human Pathology* 2013; 44: 2204-12.
35. Šelemetjev S, Đorić I, Paunović I, Tatić S, Cvejić D. Coexpressed high levels of VEGF-C and active MMP-9 are associated with lymphatic spreading and local invasiveness of papillary thyroid carcinoma. *American Journal of Pathology* 2016; 146(5): 594-602.