Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

بررسی وفور عفونت ویروس پاپیلومای انسانی HPV در ضایعات بدخیم دهانه رحم به روش PCR مولتی پلکس

دکتر الهه کیهانی [۱] *
ناصر کهن‌نیا [۱]
دکتر نرگس ایزدی مود [۲]
محمدرضا کیخایی [۱]
دکتر حسین نجم‌آبادی [۱]

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۲- بخش پاتولوژی، بیمارستان میرزا کوچک‌خان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان دهانه رحم دومین علت مرگ و میر در اثر سرطان در بین زنان می‌باشد. در این سرطان بیش از هر نوع بدخیمی دیگری، اثرات پیشگیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ‌ومیر مشهود است. از اواسط سال ۱۹۷۰ بود که ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به عنوان اتیولوژی اصلی سرطان دهانه رحم پیشنهاد گردید. مطالعات مختلف که در سراسر جهان صورت گرفته، نشان دهنده ارتباط قوی میان HPV و تغییرات پیش سرطانی و سرطانی در سلول‌های اپی تلیال می‌باشد. از آنجا که کشت سلولی و روش‌های سرولوژیک در شناسایی این ویروس و انواع آن فاقد ارزش هستند، اهمیت روش‌های ملکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در تشخیص قطعی و زودرس این ویروس آشکار می‌گردد.

روش بررسی: در این مطالعه پس از انتخاب بیماران مطابق با پروتکل مربوطه و تکمیل فرم پرسشنامه، ۱۰۰ نمونه از ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم انتخاب شدند. سپس استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی با روش استاندارد انجام گرفت. PCR مولتی پلکس با استفاده از دو جفت پرایمر (یکی به عنوان کنترل داخلی) صورت پذیرفت و محصولات PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ برده شد.

یافته‌ها: در جمعیت مورد مطالعه از میان ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم، ۷۳ مورد از نظر عفونت HPV مثبت و ۲۷ مورد منفی بودند. به عبارت دیگر میزان شیوع عفونت ویروس HPV در این جمعیت ۷۳٪ بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از مطالعه ما گزارش‌های پیشین مبنی بر ارتباط میان HPV و سرطان دهانه رحم را تقویت می‌کند.

کلمات کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) ، سرطان دهانه رحم، PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز)

* ***نشانی:*** تهران، اوین، بلوار دانشجو، روبروی دانشگاه شهید بهشتی، خیابان کودکیار، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک تلفکس: ۲۲۴۰۷۸۱۴، پست الکترونیک: ekeyhani@uswr.ac.ir

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین سرطان مسؤول مرگ و میر زنان در سراسر جهان است. اتیولوژی و پاتوژنز دهانه رحم شامل عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی است که منجر به ترانسفورماسیون سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود. مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین علل محیطی ایجاد این سرطان ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) می‌باشد که در واقع عامل ضروری برای ایجاد این نوع سرطان قلمداد می‌شود [۱]. مطالعات نشان داده‌اند که سایر عوامل محیطی ایجاد سرطان شامل سن پایین به هنگام اولین مقاربت، مقاربت‌های مکرر، داشتن شرکای جنسی متعدد، مصرف قرص ضدبارداری خوراکی و کشیدن سیگار می‌باشند. تاکنون در حدود ۸۰ زیر گروه[1] از ویروس شناخته شده‌اند که ۲۰ نوع آن در ایجاد سرطان دهانه رحم درگیر هستند و به ترتیب اهمیت زیرگروه‌های ۱۶، ۱۸، ۲۵ و ... می‌باشند [۲]. از آنجا که برای تشخیص عفونت HPV روش کشت و یا روش‌های سرولوژیک قابل اطمینانی در دسترس نیست و مطالعات مورفولوژیک نیز حتی با اعمال تکنیک‌های نوین مانند Liquid-based به تنهایی حساسیت خیلی بالایی برای تشخیص ندارند [۱، ۳]، استفاده از روش‌های ملکولی مانند PCR در بافت‌های مبتلا می‌تواند کمک کننده باشد [۴].

روش بررسی

۱۳۰ بلوک پارافینی مربوط به سرطان دهانه رحم پس از مطالعه پرونده‌های بیمارستانی و پرونده‌های بخش پاتولوژی بیمارستان زنان میرزاکوچک‌خان تهران و مرور لام‌های مربوطه بدون توجه به نوع هیستولوژیک ضایعه و تنها به عنوان بدخیمی دهانه رحم، انتخاب شدند. به بیمارانی که نمونه‌شان انتخاب شده بود اطلاع داده شد که در مطالعه وارد خواهند شد. از بلوک‌های فوق یک برش ۵-۴ میکرونی و ۲-۱ عدد برش حدود ۱۰ میکرونی تهیه شد. برش نازک‌تر جهت تأیید نهایی بافت سرطانی و علامت‌گذاری منطقه مورد نظر جهت استخراج DNA، به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ‌آمیزی شد و برش‌های ضخیم‌تر برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA از برش‌های مربوطه طبق روش استاندارد انجام شد [۵] و DNA استخراج شده از نظر کمی (۱/۹ > OD > ۱/۶) و از نظر کیفی (بعد از الکتروفورز در ژل‌آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید) کنترل شد. با استفاده از پرایمرهای MYO9 و MYO11 (جهت تکثیر ژنوم ویروسی) (شکل ۱) و PCO4، GH2O (به عنوان کنترل داخلی)، PCR مولتی‌پلکس انجام گرفت.

به عنوان کنترل مثبت از Cell line (رده سلولی) Hella استفاده گردید. سپس نمونه‌های DNA استخراج شده به همراه کنترل‌های مثبت و منفی، بلانک و مارکر V بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸٪ بارگذاری[2] شدند و ژل مربوطه توسط نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

بعد از ارزیابی DNA استخراج شده، تنها ۱۰۷ مورد جهت ادامه انجام آزمایش انتخاب شدند که از این میان ۷ مورد دیگر نیز به علت ناقص بودن اطلاعات پرونده از گروه مورد مطالعه حذف شدند و بررسی با ۱۰۰ مورد نمونهٔ بافتی ادامه یافت.

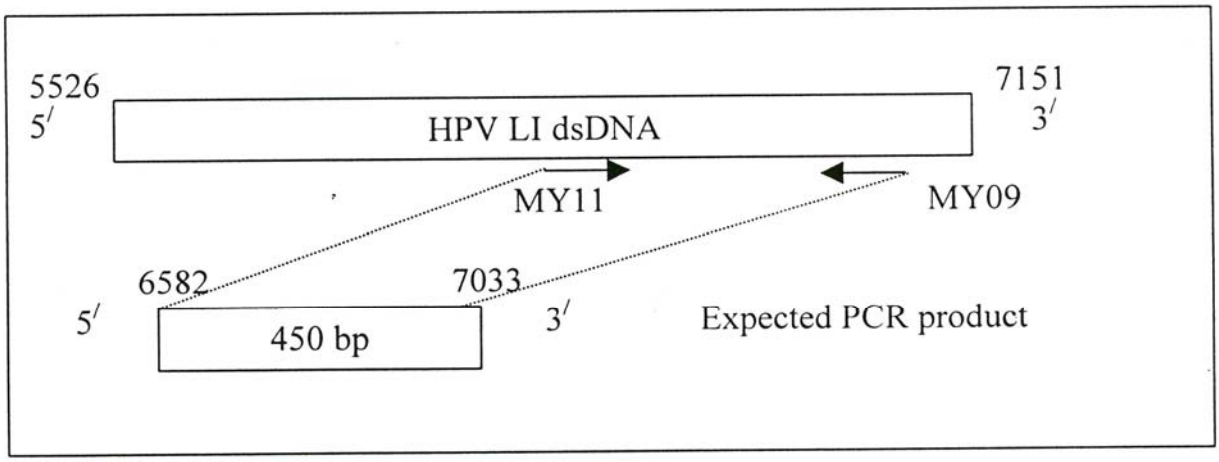
یافته‌ها

نمونه‌های بافت دهانه رحم یک صد بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم بیماران پس از انجام PCR مولتی‌پلکس با استفاده از دستگاهThermal cycler مدل Eppendorf با شرایطی مطابق جدول ۱ بررسی و برای نمونه‌های فوق به همراه کنترل‌های

1- Subtype

2- Load

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020



شکل ۱ – پرایمرهای PCR برای جداسازی ویروس پاپیلوم انسانی

مثبت و منفی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪ الکتروفورز انجام شد.

وجود هر دو باند bp۲۶۸ و bp۴۵۰ در نمونه نشانگر وجود HPV و مشاهده تنها یک باند bp۲۶۸ نشان دهنده عدم آن می‌باشد (شکل ۲).

در جمعیت مورد مطالعه ما از میان ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم،۷۳ مورد از نظر عفونت HPV مثبت و ۲۷ مورد منفی بودند. به عبارت دیگر میزان شیوع عفونت ویروس HPV در این جمعیت ۷۳٪ گزارش می‌شود.

بحث

در مطالعه حاضر برای دست یافتن به اطلاعات مربوط به وفور عفونت ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در ضایعات بدخیم دهانه رحم در زنان ایرانی، از یک صد نمونه بافت دهانه رحم که وجود بدخیمی در آنها محرز بود و مجدداً توسط دو پاتولوژیست به طور مجزا تأیید شد، استفاده گردید. در جمعیت مورد مطالعه ما (یک صد مورد) ۷۳ مورد از نظر وجود HPV مثبت و ۲۷ موردHPV منفی بودند. به عبارت دیگر میزان شیوع HPV در این جمعیت ۷۳٪ گزارش می‌شود که با نتایج سایر کشورها کاملاً مطابقت دارد. آمار جهانی نشان می‌دهند که سرطان دهانه رحم یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها نزد زنان است و در حال حاضر از نظر ابتلا بعد از سرطان پستان مقام دوم را دارد؛ ولی متأسفانه در ایران آمار دقیقی از میزان افراد مبتلا (در جمعیت زنان کشور) و همچنین میزان مرگ‌ومیر در اثر این سرطان و ارتباط این سرطان با ویروس پاپیلوم انسانی (HPV) وجود ندارد.

میزان شیوع خام سالیانه کارسینوم مهاجم سرویکس در حدود ۱۷/۳ در هر صدهزار زن برای تمام سنین و ۲۷ در هر صدهزار زن برای سنین بالای ۲۰ سالگی می‌باشد [۶].

در دو مطالعه‌ای که در اسپانیا و کلمبیا با استفاده از MYO9/11 PCR انجام شده بود [۶، ۷]، HPV DNA را در حدود ۷۵٪ از موارد تشخیص داده بودند؛ ضمناً طی گزارش دکتر محمد نیاکان و همکاران که در سومین کنگره سراسری میکروبیولوژی ایران (۳-۱ شهریور ماه ۱۳۷۹) در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی همدان ارایه کردید، میزان موارد مثبت از نظر حضور ژنوم ویروس HPV در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

جدول ۱ - ویژگی‌های پرایمرهای استفاده شده

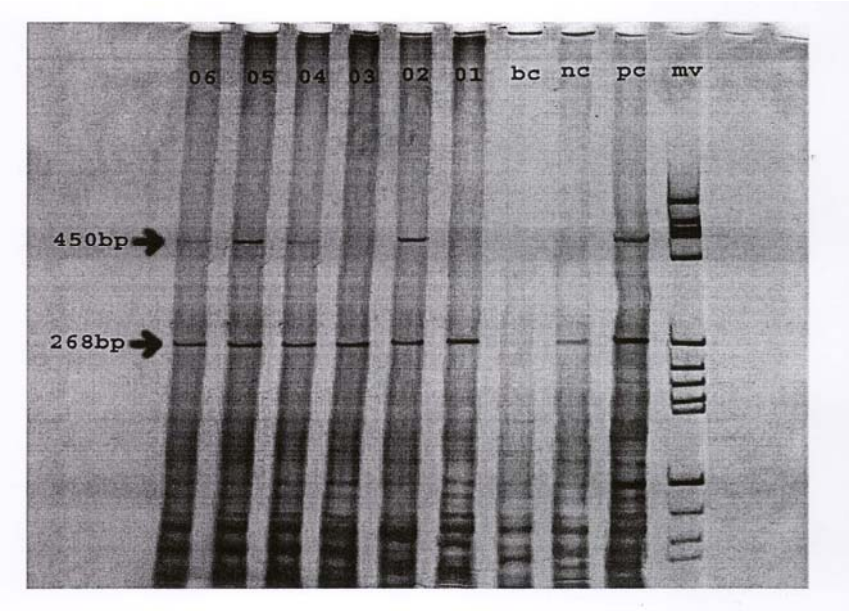
نام پرایمر	اندازه (mer)	توالی پرایمر: [a] 5' to 3'	اندازه محصول (pb)	هدف
MY۰۹	۲۰	R: CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC	۴۵۰	**HPVLI**
MY۱۱	۲۰	F: GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG		
PC۰۴	۲۰	R: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	۴۶۸	**β-globin**
GH۲۰	۲۰	F: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC		

[a]M= A+C; R=A+G; W=A+T; Y=C+T.

ضایعات دهانه رحم ۷۰٪ گزارش شد که البته در آن مطالعه از روش هیبریداسیون ملکولی In-Situ استفاده شده بود. مطالعات اپیدمیولوژیک مهم‌ترین عوامل خطر برای ایجاد سرطان دهانه رحم، بعد از HPV را : ۱) سن پایین بهنگام اولین مقاربت، ۲) وجود شرکای جنسی متعدد و ۳) تعدد مقاربت می‌دانند؛ در ادامه از عوامل دیگر می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۴) تعداد بارداری‌ها و پیدایش اولین بارداری در سنین پایین و قبل از ۱۸ سالگی، ۵) تماس جنسی با مردان پرخطر (مردانی که با زنان متعدد تماس جنسی دارند)؛ ۶) مصرف قرص‌های ضد بارداری خوراکی؛ ۷) کشیدن سیگار؛ ۸) وضعیت اجتماعی و اقتصادی پایین؛ ۹) عدم رعایت بهداشت تناسلی و ۱۰) مصرف داروهای کاهش دهندهٔ سیستم ایمنی قلمداد می‌کنند [۸].

نظر به این که در سرطان دهانه رحم به علت در دسترس بودن بافت مربوطه بیش از هر سرطان دیگری اثرات پیشگیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ‌ومیر مشهود است [۹]. احتراز از رفتارهای پرخطر و رعایت نکات بهداشت فردی و اجتماعی می‌تواند تأثیر به سزایی در



شکل ۲- یک نمونه از ژل پلی اکریل آمید

جلوگیری از ایجاد عفونت HPV و متعاقباً ضایعات پیش سرطانی و سرطانی این بافت شود.

توجه مراکز علمی دنیا در سال‌های اخیر به تولید واکسن ضد ویروس HPV رو به افزایش است [۱۰] و با توجه به وفور نسبتاً بالای ویروس در بافت‌های مبتلا به سرطان در کشور ما، می‌توان در آینده از واکسن ضد ویروس در جمعیت پرخطر استفاده کرد.

همچنین انواعی از داروهای اینترفرون در درمان ضایعات مرتبط با عفونت HPV استفاده می‌شود [۱۱] که لازمه استفاده از این درمان، تشخیص وجود عفونت در بافت‌های مبتلاست؛ لذا به نظر می‌رسد انجام آزمایش‌های ملکولی به همراه سایر بررسی‌ها در ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم و حتی اسمیرهای سرویکوواژینال (پاپ اسمیر) که مشکوک به عفونت HPV هستند، ضروری است.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

Tehran University Medical Journal; Vol. 64, No. 3, June 2006: 95-101

The prevalence of human papilloma virus(HPV)in malignant cervical lesion, using multiplex PCR

E. Keyhani* [1]
N. Kohannia [1]
N. Izadimood [1]
M. R. Keyhkhaee [1]
H. Najmabadi [1]

1- Genetics Research Center, University of social welfare and Rehabilitation sciences, Tehran, Iran
2- Department of Pathology Mirzakouchak khan Hospital, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran

* Genetics Research Center, University of Social welfare and Rehabilitation, Daneshdjou Blv., Evin, Tehran, Iran,
Telefax: +98(21)22407814
E-mail: ekeyhani@uswr.ac.ir

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is the second leading cause of cancer death among women. In this cancer, the effects of prevention, early diagnosis and treatment more than other cancers decrease the mortality rate. In 1970 human papilloma virus (HPV) was introduction as major etiologic factor of cervical cancer. Different studies throughout the world revealed strong correlation between HPV and cancerous & precancerous changes in epithelial cells. Since cell culture and serological methods can not recognize the virus and its subtypes, the importance of the molecular methods including polymerase chain reaction (PCR) in early and definite diagnosis of virus is obvious.
Methods: In this study, after patient selection using the related protocol and completion of the questionnaires, 100 samples from cancer lesions of cervix selected. Then DNA extraction from paraffin blocks performed using standard method. Multiplex PCR with two pairs of primer (one as internal control) performed and the PCR product run on 8% polyacrylamid gel.
Results: The results showed that 73% of the tissues were infected by HPV.
Conclusion: This finding confirm the previous results based of correlation between HPV,and cervical cancer.

Keywords: Human papilloma virus (HPV), cervical cancer, polymerase chain reaction (PCR)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:13 IRST on Saturday October 31st 2020

References

1. Cox JT. Human papiloma virus testing in primary cervical screening and abnormal papaniculaou management. *Obstet Gynecol Surv* 2006 6 (supp1): 515-525.
2. Roberts CC,Tadesse AS,Sands J,Halvorsen T&et al. detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type -specific PCR and reverse line blot assays. *J Clin Virol* 2006; 7: 36: 277-82.
3. Sharma A,Menon u .screening for gynecological cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 6: [Epubahead of print]..
4. Lazo PA. The molecular genetics of Cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1990; 80: 2008-18.
5. Chan PK,Tokf YU MY,Cheung JL,Cheng AF& et al. Evaluation of extraction method from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 2002; 54: 401-3.
6. Castle PE,Hillier SL,Rabe LK,Hildesheim A & et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). Cancer Epidemiol. *Biomarkers prev* 2001; 10: 1021-7.
7. Bosch FX,Lorincz A,Munoz N,Meijer CJ & et al. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-265. Ferreira A,Velema JP,Figueroa M,Bulnes R & et al Co-Factors related to the causal relationship between human papilloma virus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol* 2000; 29: 817-25.
8. Herrington CS. Self testing for human papilloma virus. *J Clin Pathol* 2002; 55: 408-9.
9. Giles M,Garland S. Human papiloma virus infection: an old disease, a new vaccine. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 2006; 46: 180-5.
10. McGlennen RC. Human Papilloma virus oncogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20: 383-404.