تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) در ضایعات سرطان سرویکس با روش هیبریدیزاسیون ملکولی

محمد نیاکان(Ph.D.) [۱]، **احیاء گرشاسبی(M.D.)** [۲]، **محمد رضا جلالی(M.D.)** [۳]، **مدرس گیلانی (M.D., Ph.D.)** [۴]، **سقراط فقیه زاده(Ph.D.)** [۵]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۲- استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

۳- استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه شاهد

۴- استادیار گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- استادیار گروه آمار حیاتی، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

بیش از ۹۰ درصد ضایعات سرویکس بعلت ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) است ولی اطلاعات کمی در ارتباط بانقش ژنوم ویروس و شناسایی سریع انواع متفاوت آن در دست می باشد. در این تحقیق تنوع تیپ های ویروس HPV با استفاده از روش هیبریدیزاسیون ملکولی Insitu Hybridization (ISH) تعیین گردیده است. از ضایعات سرویکس ٦٠ بیمار مبتلا به کانسرسرویکس بیوپسی تهیه و در فرمالین ۱۰٪ ثابت و مقاطع پارافینی مورد مطالعه پاتولوژی قرار گرفت. تکنیک ISH (Insitu Hybridization) با مواد و پروب‌های نشاندار شده با بیوتین (biotinylated probes) انجام گردید. حضور ژنوم ویروس HPV و تیپ‌های مختلف آن مورد شناسایی و تعیین شد. ٤٢ مورد از ٦٠ نمونه مورد مطالعه (۷۰٪) از نظر آلودگی با HPV مثبت بود و از ۱۸ مورد (۳۰٪) ژنوم ویروس جدا نگردید. تیپ های ویروس HPV در سه گروه :٦/١١ ، ١٦/١٨ و ٣١/٣٣/٥١ مورد مطالعه قرار گرفت که ۱۳ نمونه (٢١/٦٦٪) نسبت به گروه ٦/١١ و تعداد ١٤ مورد (٢٣/٣٣٪) نسبت به گروه ١٦/١٨ و در نزد ١٥ بیمار (٢٥٪) نسبت به گروه ٣١/٣٣/٥١ واکنش مثبت با روش هیبریدیزاسیون ملکولی مشاهده گردید. این یافته ها نشان می دهد، مطالعات ملکولی در شناسایی ژنوم ویروس HPV امکان پذیر بوده و از سرطان های دهانه رحم بانوان ایرانی انواع مختلف ویروس HPV به فراوانی جدا می گردد.

گل واژگان: ویروس پاپیلومای انسانی، هیبریدیزاسیون مولکولی، سرطان دهانه رحم، پاتولوژی

آدرس مکاتبه: تهران دانشگاه شاهد دانشکده پزشکی صندوق پستی ٧٤٣٥-١٤١٥٥

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

تیپ های مختلفی از ویروس HPV [1]باعث آلودگی و بروز بیماریهای مقاربتی میگردد. (۵و۱). تنوع ضایعات این ویروس زیاد است و از زگیل‌های خوش خیم پوستی که خود محدود شونده[2] بوده و اغلب روی دست و پا ظاهر می شوند تا ضایعات بدخیم و تهاجمی بصورت سرطان کشنده دهانه رحم (سرویکس) تظاهر می‌نماید (۸ و۷ و۵ و۳). سرطان سرویکس در تمام دنیا شایع بوده و دومین سرطان مرگ‌آور نزد خانمها می باشد. شیوع آلودگی در جوامع مختلف متفاوت است. در خانمهای جوان اروپایی میزان آلودگی تا ٤٦٪ گزارش شده است (۱۳و٦و۲). کوندیلوما آکومیناتا (زگیل آنوژنیتال) از شایعترین بیماریهای ویروس است که از طریق تماس جنسی (STD) [3]منتقل می گردد (۷و٤). گسترش جهانی سرطان سرویکس زیاد است و در دنیا سالیانه حدود ٤٤٠/٠٠٠ بیمار جدید از طریق WHO و CDC شناسایی وگزارش می شود (۱۳و۱۰و٦). ارتباط مستقیم سرطان دهانه رحم و آلودگی با ویروس HPV ثابت شده می باشد و بخشی از ژنوم ویروس (پروتئین های E1-7) عامل ترانسفورمه شدن سلولهای بدخیمی، تغییرات کروموزومی در سلولهای اپی‌تلیال سرویکس و بروز سرطان رحم هستند (٦و٤).

سرطان ممکن است به یکی از اشکال بدخیم مانند: CIN [4] و یا SCC [5] ظاهر شود (۱۳و۷) . تا کنون بیش از ۸۰ نوع ژنوتیپ ویروس HPV شناسایی شده است ولی عمدتاً تیپ های: ٥٦و٥١و٤٥و٣٥و٣٣و١٨و١٦و١١و٦ موجب ضایعات سرطانی می شوند که معمولاً پس از دورهٔ کمون آلودگی ٤-١ سال حدود ١٦٪ ضایعات بطرف بدخیمی با درجات بالا سیر می کند (۷و٦و٤) .

مواد و روشها

از ٦٠ بیمار مبتلا به سرطان سرویکس (نئوپلاستیک و کارسینوما) در بخش انکولوژی زنان بیمارستان امام خمینی تهران بیوپسی از دهانه رحم تهیه گردید. میانگین سنی بیماران ٢٢±٤١ سال بود. بیوپسی بافتی فیکس شده با فرمالین و پارافین اندود گردیده و پس از تهیه مقاطع روی اسلاید مورد مطالعه پاتولوژی قرار گرفت. پس از تائید بدخیمی ناحیه سرویکس آزمایشهای هیبریدیزاسیون ملکولی (ISH) [6]با موادی که از شرکت ENZO تهیه گردیده بود انجام شد. خلاصه روش آزمایش هیبریدیزاسیون بدین شرح است که مقاطع بافتی به قطر ٦-٤ میکرون از بیوپسی پاتولوژی تهیه و به مدت ١٨-٢ ساعت در دمای ٨٠-٦٠ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت، از اسلایدهای فوق الذکر حذف پارافین توسط ٨ مرحله با مواد گزیلول و اتانول با درجات مختلف انجام می شد. پس از انکوباسیون در ٣٧° C (١٥ دقیقه) آنزیم پروتئیناز K را تاثیر داده و مجدداً انکوباسیون و مراحل آبگیری با الکل صورت میگرفت. پس از تاثیر دادن پروب های اختصاصی DNA ویروس HPV ، نمونه ها به مدت ١٠-٨ دقیقه در دمای ٣±٩٥ قرار داده و سپس در بافر شستشو گذاشته و ٠/٥ میلی لیتر از ماده تعیین کننده مخصوص به هر اسلاید اضافه می گشت، پس از شستشو و افزودن سوبسترا و ماده AEG و انکوباسیون، اسلایدها شستشو، خشک و مورد مطالعه قرار می‌گرفت. مجموعه آزمایش در ٢١ مرحله می باشد که در نهایت اسلایدها

1- Human Papilloma Virus
2- Self limiting
3- Sexual Transmited Disease
4- Cervical Intraepithelial Neoplasia
5- Squamous Cell Carcinoma
6- Insitu Hybridization

Downloaded from http://www.jri.ir

با میکروسکوپ نوری بررسی می گردد. نشاندار شدن سلول های آلوده به ویروس و ژنوم آن بصورت خوشه ای و با رنگ قرمز درخشان بعنوان واکنش مثبت ظاهر می شوند. در کلیه مراحل اسلاید کنترل مثبت و منفی نیز بعنوان شاهد وجود دارد. (بطور مثال اسلاید کنترل مثبت از سلول های Caski آلوده به ویروس ۱۶- HPV تهیه گردیده بود).

نتایج

انجام آزمایشهای هیبریداسیون نشان داد که اندازه نمونه ها می بایست حداقل µg ۲۰۰ از تومور و ترجیحاً سلول های نئوپلاستیک ، آدنوکارسینوم و اسکوآموس سل کارسینوما (SCC) باشند. نمونه‌ها بهتر است از ناحیه آندوسرویکس و شامل سلولهای اپیتلیال تهیه گردد.

بدنبال انجام آزمایشهای سیتولوژی و پاتولوژی تشخیصی جهت ٦٠ نفر از خانمهای مبتلا به سرطان دهانه رحم آزمایش ISH نیز صورت گرفت. پروب های مورد استفاده درگروههای اول تا سوم دسته بندی شدند. مواردی که نسبت به گروه اول (HPV ٦/١١) پاسخ مثبت نشان دادند، ١٣ نمونه (٢١/٦٦٪) بود، تعداد ١٤ نمونه (٢٣/٣٣٪) با پروب های گروه دوم (HPV ١٦/١٨) واکنش دادند و ١٥ مورد (٢٥٪) از بیوپسی های حاوی ژنوم گروه سوم (HPV ٣١/٣٣/٥١) بودند. لذا در مجموع ٤٢ نمونه (٧٠٪) مثبت و ١٨ مورد (٣٠ ٪) فاقد ژنوم های هفتگانه فوق از ویروس HPV گزارش گردید جدول (١و٢).

جدول شماره ۱ : نتایج بررسی پاتولوژی و میزان HPV مثبت با روش ISH

تشخیص پاتولوژی	تعداد نمونه	HPV مثبت - درصد
SCC	۳۰	۲۲ - (۳۶/۶۶)
CIN	۱۸	۱۱ - (۱۸/۳۳)
Dys-meta	۱۲	۹ - (۱۵)
جمع	۶۰	۴۲ - (۷۰)

جدول شماره ۲ : میزان حضور تیپ های ویروس HPV در بیوپسی سرطان سرویکس

انواع ویروس / ضایعه	۶/۱۱ + / -	۱۶/۱۸ + / -	۳۱/۳۳/۵۱ + / -	جمع + / -
SCC	۸ / ۲	۷ / ۳	۷ / ۳	۲۲ / ۸
CIN	۲ / ۴	۵ / ۱	۴ / ۲	۱۱ / ۷
Dys-meta	۳ / ۰	۱ / ۲	۴ / ۲	۹ / ۳
جمع	۳ / ۶	۱۴ / ۵	۱۵ / ۷	۴۲ / ۱۸
درصد	(۲۱ / ۶۶)	(۲۳ / ۳۳)	(۲۵)	(۷۰-۳۰)

بحث

با توجه به شیوع فراوان ویروس HPV در جامعه افراد سالم و بیمار و امکان بروز بدخیمی و عواقب خطرناک بدنبال فعالیت ژنوم آن در بدن و نظر باینکه آزمایشهای سیتولوژی و پاتولوژی بتنهایی نمی توانند پاسخگویی وضعیت آلودگی ویروس و پیش آگهی بیماریهای مربوطه باشند لذا استفاده از تکنیک ISH با استفاده از پروب های اختصاصی توصیه می شود. با

Downloaded from http://www.jri.ir

بهره گیری از این روش می توان میزان شیوع و انواع متفاوت ویروس را شناسایی نمود زیرا در این روش با وجود فقط ۲۵-۲۰ کپی از ژنوم DNA ویروس در سلول بافتی قابلیت ردیابی و تشخیص وجود دارد.

در این تحقیق نشان داده شد که آلودگی ویروس HPV در نمونه های سرطان سرویکس زیاد است (حدود ۷۰٪) و بیشترین درصد حضور ژنوم ویروس در ضایعات SCC (۷۳/۳۳٪) دیده می‌شود (جدول ۲) .

در سرطان سرویکس متاپلازی سلول های اپتلیوم ایجاد می شود و خطر انتقال و آلودگی در جامعه وجود دارد. عفونتهای مخفی تقریباً در نزد ۱۰٪ از افراد دارای فعالیت جنسی دیده می‌شود، آلودگی بیشتر بستگی به عواملی مانند سن ازدواج، سطح فرهنگی، رفتاری و فعالیت جنسی غیر طبیعی ، مصرف دخانیات ، عفونت ناحیه ژنیتال و غیره دارد. بررسی با روش ISH این امکان را ایجاد می کند که بیش از ۹۰٪ از موارد آلودگی شناسایی شود. در روش قدیمی آزمایش پاپ اسمیر، امکان بروز پاسخ های منفی کاذب به میزان بالا وجود دارد، اخیراً روشهای Bethesda system,Thin prep وPCR نیز پیشنهاد گردیده است.

نتیجه کلی اینکه استفاده از روش حساس ISH در تشخیص سرطان سرویکس و تعیین حضور ژنوم ویروس HPV مفید بوده و بعلاوه اینکه با این تکنیک میتوان انواع مختلف ویروس را در افراد بیمار و حتی بظاهر سالم نیز شناسایی نموده و بهره گرفتن از این سیستم میتواند به مطالعات اپیدمیولوژی ویروس HPV درجامعه کمک بزرگی بنماید.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با هزینه و امکانات دانشگاه شاهد انجام گردیده است لذا از معاونت پژوهشی، محققین محترم همکار ومسئولین گرامی در پژوهشکده ابن سینا کمال تشکر را داریم.

References:

1. Reitano M. Counseling patients with Genital warts. Am J Med. 1997, 102 (5A):35-43
2. Turazza E, Lapena A, sprovieri O, et al. low-risk human papilloma virus type 6 and 11 associated with carcinomas of the genital and upper aero – digestive tract acta. Obstet Gynecol Scand. 1997, 79:271-276.
3. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, et al. Anal cytological abnormalities and anal HPV infection in men with centers for disease control group IV HIV disease. Genitourin Med. 1997, 73:174-180.
4. Strehler E, sterzik K, Malthaner D, et al. Influence of ovarian stimulation on the detection of human papilloma virus DNA in cervical scrapes obtained from patients undergoing assisted reproductive techniques. Fertil Steril. 1999, 71(5): 815-20.
5. Motoyasu sugase, Toshihiko M. Distinct manifestations of Human papilloma viruses in the vagina. Int J Cancer. 1997, 412 - 415.
6. Volker A, Carlo, Mirka S, et al. Detection and Typing of Human papillomavirus in Biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction and restriction enzyme Analysis. J Med Viro. 1996, 48: 161 - 170.

Downloaded from http://www.jri.ir

7. Rezza G, Giuliani M, Branca M, et al. Determinats of squamous intraepithelial lesions (SIL) on pap smear the role of HPV infection and HIV-1-induced immuno suppresion dianaids collaborative study group. Eur J Epidemiol. 1997, 13(8):937-43.
8. Kjaer SK, Van den Brule AJ, Bock JE, et al. Determinants for genital human papilloma virus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish with normal pap smear. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997, 6(10):799-805.
9. Van Muyden RC, Ter Garnsek BW, Smedts FM, et al. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinoma in Russian women a prognostic study. Cancer. 1999, 85(9):2011-6.
10. Cuzick J, Beverly E, Ho L,Tervy G, Mielzynska I, lorincz A. HPV testing in primary screening older women. Br J Cancer. 1999, 81(3):554-8.
11. Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of korean women. J Korean Med Sci. 1999, 14(6):593-9.
12. Harnish DG, Velland LM, scheid EE, et. al. Evaluation of human papilloma virus-consensus for HPV detection by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1999, 13(1):9-21.
13. Konno R, Paez CL, Sato S, et al. HPV, histologic grade and age Risk factors for the progression of cervical intraepithelial neoplasia. J Repord Med. 1998, 43(7): 561 - 6.

Downloaded from http://www.jri.ir