● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۵، ص ۴۵۹-۴۵۰، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

فراوانی و ژنوتایپینگ نمونه‌های پاپ‌اسمیر دیسپلاستیک و سرطانی از نظر ویروس پاپیلومای انسانی در شهر کرمان با تکنیک‌های ردیابی DNA

ناهید منصفی[1]، شهریار دبیری[2,3*]، مهسا عباس‌زاده[4]، حسین صافی‌زاده[5]، رضا فتوحی اردکانی[6]، سحر امیرپور رستمی[7]، زهرا کامیابی[8]، طاهره اشرف‌گنجویی[8]، ناهید افتخاری[8]، ویدا مدرس‌نژاد[8]، ویکتوریا حبیب‌زاده[9]، طیبه نادری[8]، فاطمه میرزایی[10]

خلاصه

مقدمه: سرطان سرویکس دومین سرطان شایع زنان در سراسر جهان است. امروزه، برنامه‌های غربالگری باعث کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری و شیوع آن شده است. مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی نشان می‌دهد که انواع خاصی از ویروس‌های پاپیلومای انسانی (Human papillomavirus) از نوع کارسینوژن بوده و می‌توانند علت اصلی ایجاد سرطان سرویکس باشند. شایع‌ترین انواع پر خطر آن، ژنوتیپ‌های HPV۱۶ و HPV۱۸ می‌باشند. در مطالعه حاضر، فراوانی ژنوتیپ‌های متفاوت HPV در زنان مراجعه کننده برای انجام پاپ‌اسمیر معمول به یکی از کلینیک‌های سرپایی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، با روش‌های مبتنی بر ردیابی DNA بررسی شد.

روش: مطالعه حاضر از نوع مقطعی- تحلیلی بود. این پژوهش بر روی ۲۰۰۰۰ نمونه پاپ‌اسمیر که طی چهار سال متوالی از خانم‌های بین سنین باروری ۵۰-۱۵ سال مراجعه کننده به مراکز دانشگاهی و خصوصی در سطح شهر کرمان تهیه شده بود، انجام شد. تمام نمونه‌ها درآزمایشگاه بیمارستان‌های افضلی‌پور، باهنر و آزمایشگاه‌های خصوصی سطح شهر جمع‌آوری و از بین آن‌ها نمونه‌های تیپیک دیسپلازی و سرطان توسط دو پاتولوژیست و یک دستیار پاتولوژی طبق استانداردهای موجود توسط سازمان بهداشت جهانی جدا گردید و وارد مطالعه شد. DNA نمونه‌ها استخراج شد و با روش‌های ردیابی DNA و PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۲۰۰۰۰ مورد پاپ‌اسمیر بررسی شده، ۸۲ مورد ضایعات دیسپلاستیک یا سرطانی داشتند که در ۶۲ مورد، ضایعه دیسپلاستیک و در ۲۰ نمونه هم SCC (Squamous cell carcinoma) تشخیص داده شد. در مجموع، ۳۲ نفر از آن‌ها (۳۹ درصد) از نظر HPV مثبت بودند. از کل نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده، فقط دو مورد ژنوتیپ ۱۸ (۶/۲۵ درصد) و یک مورد ژنوتیپ مخلوط ۱۶ و ۳۱ و بقیه ژنوتیپ ۱۶ (۹۳/۷۵ درصد) تشخیص داده شد. از پاپ‌اسمیرهای دیسپلاستیک ۲۰ مورد (۳۲/۲ درصد) و از نمونه‌های SCC ۱۲ مورد (۶۰ درصد) از نظر HPV مثبت بودند (P<۰/۰۵)، همچنین در مقایسه سن افراد بر حسب تشخیص نوع ضایعه، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد و مبتلایان به SCC جوان‌تر از مبتلایان به دیسپلازی بودند (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و فرهنگ خاص خانوادگی ایران، عفونت HPV در بین زنان دچار سرطان سرویکس نسبت به سایر کشورها شیوع کمتری دارد. ژنوتیپ غالب HPV۱۶ بود که از ژنوتیپ‌های کارسینوژن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تایپینگ HPV، پاپ‌اسمیر دیسپلاستیک، ردیابی DNA، ایران، Squamous cell carcinoma (SCC)، سرطان دهانه رحم

۱- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۶- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۷- عضو مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۸- دانشیار، گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۹- استاد، گروه زنان و مامایی، بخش ناباروری، بیمارستان افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۱۰- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: dabiri12@yahoo. com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۱۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱۶

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرطان سرویکس دومین سرطان شایع در خانم‌ها در سراسر جهان گزارش شده است. امروزه برنامه‌های غربالگری باعث کاهش مرگ و میر ناشی از این بیماری و شیوع آن شده است، اما همچنان سالانه ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید سرطان مهاجم سرویکس تشخیص داده می‌شود که حدود ۸۰ درصد آن‌ها در کشورهای پیشرفته رخ داده است. مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی نشان می‌دهد که انواع خاصی از ویروس‌های پاپیلومای انسانی، علت اصلی ایجاد سرطان سرویکس می‌باشند (۲، ۱). ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV یا Human papillomavirus) از خانواده پاپیلوما ویریدا هستند. تاکنون ۱۱۸ تایپ ویروس بر اساس خصوصیات بیولوژیک، پتانسیل انکوژنیک وموقعیت فیلوژنتیک مشخص شده‌اند. حدود ۳۵ نوع از ویروس HPV که به طور شایع در دستگاه ژنیتال یافت می‌شوند، جزء دسته آلفا پاپیلوما ویروس تقسیم‌بندی می‌شوند. بر اساس شواهد اپیدمیولوژی مولکولی، انواع HPV ژنیتال به دو زیر گروه کم خطر (Low-risk) و پر خطر (High-risk) تقسیم می‌شوند (۴، ۳).

چندین نوع HPV مثل ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹ و ۶۶ در سرطان‌زایی سرویکس (High-risk types) نقش دارند، در حالی که بقیه انواع HPV مثل ۶ و ۱۱ اغلب در ضایعات خوش‌خیم مانند کندیلوما آکومیناتا دیده می‌شوند. زنانی که به گونه‌های پر خطر HPV آلوده‌اند، نسبت به زنانی که با ویروس آلوده نشده‌اند یا با گونه‌های کم خطر آن آلودگی دارند، در معرض خطر بیشتری برای سرطان سرویکس هستند. HPV نوع ۱۶ شایع‌ترین نوع در سراسر جهان می‌باشد (۵). انواع ۱۸، ۴۵، ۳۱ و ۳۳ گروه‌های شایع بعدی هستند. در آسیا، نوع ۵۸ و HPV۵۲، گروه شایع بعد از ۱۶ و HPV۱۸ می‌باشند. در ۱۰ تا ۲۰ درصد موارد HPV مثبت، آلودگی چند ژنوتیپی دیده می‌شود (۷-۵).

یافته‌های اپیدمیولوژی در ترکیب با مطالعات غربالگری، اغلب نشان دهنده نقش انواع خاص HPV در ایجاد سرطان سرویکس است. بررسی DNA ویروس HPV به همراه بررسی سیتولوژی پاپ‌اسمیر، برای بهبود حساسیت غربالگری و افزایش اختصاصی بودن در تشخیص، پیش‌آگهی و مدیریت درمانی استفاده می‌شوند (۱۱-۸).

حساسیت سیتولوژی سرویکس اغلب ۶۰-۵۰ درصد بیان شده است. همچنین این انتقاد وجود دارد که در وضعیتی مثل جمعیت واکسینه شده که شیوع HPV پایین‌تر می‌باشد، سیتولوژی دقت کمتر با حساسیت و ارزش اخباری مثبت پایین‌تری خواهد داشت.

در حال حاضر، روش‌های مبتنی بر DNA مثل هیبریداسیون و PCR (Polymerase chain reaction)، برای ردیابی DNA در HPV از دقیق‌ترین روش‌های مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی در کیت INNOGENETICS® می‌باشد (۱۲، ۴). حساسیت قابل توجه آزمایشات مبتنی بر DNA، در تشخیص HPV بالای ۹۰ درصد می‌باشد. بنابراین فواید این آزمایشات هنگام مقایسه با سیتولوژی سرویکس آشکار می‌شود.

حساسیت پایین سیتولوژی سرویکس در سراسر جهان به‌طور شایع گزارش شده است (۵، ۴). علاوه بر این، اهمیت ژنوتایپینگ HPV در تشخیص، به طور فزاینده‌ای در افتراق عفونت‌های پر خطر از کم خطر و همچنین در توسعه استراتژی‌های مداخله سرطان از قبیل آماده‌سازی واکسن، به رسمیت شناخته شده است. بنابراین، ژنوتایپینگ HPV در آمادگی‌های بالینی، به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم برای تشخیص سرطان دهانه رحم در نظر گرفته می‌شود و همچنین به عنوان وسیله‌ای برای فراهم آوردن اطلاعات با ارزش لازم، برای پیشگیری و درمان آن به کار می‌رود (۱۵-۱۳).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که شیوع ژنوتیپ‌های مختلف در مناطق مختلف دنیا متفاوت است که این موضوع

Archive of SID
www.SID.ir

نشان از اهمیت بررسی اپیدمیولوژیک منطقه‌ای HPV دارد. به عنوان مثال، افراد نمونه در مطالعه Sturegard و همکاران در سودان، ۶۲ درصد ژنوتیپ ۶، ۱۳ درصد ژنوتیپ ۱۶ و ۱۰ درصد ژنوتیپ ۱۱ را داشته‌اند (۱۶)؛ در حالی که در مطالعه‌ای در اروگوئه، ژنوتیپ ۱۶ در ۶۷/۶ درصد و سایر ژنوتیپ‌ها اعم از ۱۸، ۴۵ و ۳۳ به ترتیب در ۸/۵، ۶/۸ و ۳/۲ درصد افراد نمونه مشاهده شده است (۱۷). در ایران هم مطالعه غفاری و همکاران در دو بیمارستان امام خمینی و میرزا کوچک‌خان در تهران بیشترین ژنوتیپ‌ها HPV۱۶ (۷۵ درصد) و HPV۱۸ (۱۲/۷ درصد) بوده است (۸).

تاکنون مطالعه مشابهی روی پاپ‌اسمیرهای دیسپلازی و کانسر در ناحیه جنوب شرق (استان کرمان) با تعیین ژنوتیپ انجام نشده است. در این مطالعه، فراوانی ژنوتیپ‌های متفاوت HPV در زنانی که برای انجام پاپ‌اسمیر معمول به یکی از کلینیک‌های سرپایی دانشگاه علوم پزشکی کرمان مراجعه کرده‌اند، با روش‌های ردیابی DNA مانند PCR و هیبریدیزاسیون مورد بررسی قرار گرفته است. تشخیص‌های سیتولوژی نیز بر اساس Bethesda system بر روی نمونه‌ها انجام شده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مقطعی- تحلیلی بود و بر روی ۲۰۰۰۰ نمونه پاپ‌اسمیر که طی چهار سال متوالی از خانم‌های بین سنین باروری (۵۰-۱۵ سال) مراجعه کننده به مراکز دانشگاهی و خصوصی در سطح شهر کرمان جمع‌آوری شده بود، انجام شد. پس از هماهنگی قبلی، تمام این نمونه‌ها در آزمایشگاه بیمارستان‌های افضلی‌پور، باهنر و آزمایشگاه‌های خصوصی سطح شهر، جمع‌آوری و از بین آن‌ها، نمونه‌های تیپیک دیسپلازی و سرطان توسط دو پاتولوژیست و یک دستیار پاتولوژی طبق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی جدا گردید. این فرایند در سه مرحله شامل آماده‌سازی نمونه‌ها، استخراج DNA و تکثیر DNA انجام گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت استخراج (Pretreatment of sample)

تعداد ۱۰۰ نمونه از کل موارد جهت آماده‌سازی برای استخراج انتخاب گردید. سپس لام‌های تهیه شده به مدت یک شبانه روز در محلول گزیلل قرار داده شد. سپس با الکل مطلق شستشو گردید و پس از خشک شدن لام‌ها تراشیده و برای ورود به مراحل استخراج، آماده گردید.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از کیت RIBO-prep (Nucleic acid extraction kit) استفاده شد که روش استخراج به طور خلاصه شامل مراحل زیر می‌باشد:

۱. لیز سلول با محلول لیز کننده، ۲. آماده شدن برای رسوب‌گیری (Precipitation)، ۳. شستشوی DNA در دو مرحله و ۴. رسوب‌گیری نهایی DNA. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز بررسی گردید.

تکثیر DNA

در این مرحله از کیت INNO-LIPA HPV Genotyping Extra با نام تجاری ®INNOGENETICS استفاده شد (۴) که دارای دو بخش مجزای بخش تکثیر ژنوم اصلی HPV و بخش هیبریداسیون جهت تعیین ژنوتیپ بود.

مراحل تکثیر DNA، شامل چهار مرحله زیر بود:

۱. تکثیر DNA استخراج شده، ۲. هیبریداسیون محصول تکثیری روی نوار به وسیله شستشوی دقیق، ۳. اضافه کردن کونژوگه و سوبسترا برای ایجاد رنگ و ۴. استفاده از نرم‌افزار ®LIRAS.

Archive of SID
www.SID.ir

اصول انجام آزمایش PCR و تکثیر DNA

جداسازی طیف وسیعی از ژنوتیپ‌های HPV، ضرورت استفاده از پرایمرهای هدف برای یک ناحیه حفاظت شده در ژنوم HPV بین ژنوتیپ‌های مختلف را ایجاب می‌کند. بهترین منطقه حفاظت شده در ژنوم HPV، منطقه L1 می‌باشد و چندین آزمایش پرایمر اختصاصی برای این منطقه وجود دارد (۱۸). در این کیت، ۱۰ ست پرایمر اختصاصی منطقه ۶۵ جفت بازی L1 منطقه بیانی ژن (CDS) با توانایی تکثیر ۵۴ نوع HPV وجود داشت.

در مرحله Amplification، مقدار ۳۷/۷ میکرولیتر محلول AMP MIX با ۲/۳ میکرولیتر ENZ MIX برای یک نمونه باورتکس به خوبی مخلوط شد و ۴۰ میکرولیتر از مخلوط آماده شده، به هر یک از تیوب‌ها همراه با کنترل مثبت و منفی اضافه گردید. ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده نیز به آن‌ها اضافه شد. سپس وارد مراحل پروتکل دمایی واکنش در دستگاه PCR (*MyGenie*™ 32 thermal block from Bioneer) بر طبق کیت گردید. لوله‌ها از دستگاه برداشته شد و تا آماده‌سازی مراحل هیبریداسیون، در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

هیبریداسیون

این کیت بر اساس اصول هیبریداسیون معکوس بود. قسمتی از منطقه L1 ژنوم HPV که با استفاده از ۱۰ پرایمر اختصاصی تکثیر شده و حاصل آن به صورت امپلیکون بیوتینه شده در دسترس بود، دوباره دو رشته DNA را باز می‌کرد و با پروب‌های اولیگونوکلوتید اختصاصی هر ژنوتایپ هیبرید می‌شد. برای کنترل کیفی و مانیتورینگ نمونه‌ها و چک کردن استخراج، یک جفت پرایمر ژن HLA-DPB1 انسانی همراه با نمونه‌ها تکثیر می‌شد. همه پروب‌ها روی یک خط موازی از نوارهای غشایی ثابت شدند. بعد از هیبریداسیون و شستشوی دقیق، آنزیم الکالن فسفاتاز کنژوگه شده با استرپتاویدین اضافه گردید که می‌توانست با هیبریدهای بیوتینه شده قبلی اتصال یابد. بعد از انکوبه کردن با کروموژن BCIP/NBT، محصول آن رسوب ارغوانی بود و نتیجه آن به وسیله نرم‌افزار LIRAS®For LIPA HPV تفسیر می‌شد. این کیت با کد EP Patent 1012348B,US Patent 6482588B ثبت اختراع شده بود.

وارسی مجدد (Recheck) و تأیید ژنوتیپ‌های ۱۸ و HPV۱۶ با کیت Amplisenc®HPV Screen-titre FRT

با این کیت به روش Real-time PCR، تعدادی از نمونه‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب و از نظر ژنوتیپ ۱۸ و HPV۱۶ تأیید مجدد گردید. برای کار با این کیت، از دستگاه (from Bioneer*Exicycler*™ 96 Real-time) استفاده گردید. همچنین تعداد بیشتری از نمونه‌ها با کیت AmpliSens®HPV HCR screen-Eph با روش PCR معمولی و تأیید با ژل الکتروفورز غربالگری گردید (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های استخراج شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور توصیف داده‌ها از شاخص‌های مرکزی، پراکندگی و همچنین جدول و نمودار استفاده گردید و آزمون‌های Chi-square و t برای تحلیل داده‌ها به کار گرفته شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در آزمون‌ها مد نظر قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه از ۲۰۰۰۰ مورد پاپ‌اسمیر بررسی شده، ۸۲ مورد ضایعات دیسپلاستیک یا سرطانی داشتند (حدود ۰/۵ درصد)، که ۶۲ نمونه پاپ‌اسمیر دیسپلاستیک (۷۵/۶ درصد) و ۲۰ نمونه هم Squamous cell carcinoma (SCC) (۲۴/۴ درصد) تشخیص داده شدند.

از تعداد ۶۲ نمونه پاپ‌اسمیر دیسپلاستیک، ۳۵ مورد دیسپلازی خفیف (۵۶/۴۵ درصد)، ۲۶ مورد دیسپلازی

Archive of SID

www.SID.ir

متوسط (۴۱/۹۴ درصد) و ۱ مورد هم دیسپلازی شدید (۱/۶۱ درصد) وجود داشت.

در مجموع، ۳۲ نفر (۳۹ درصد) از آن‌ها از نظر HPV مثبت بودند. از کل نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده، فقط دو مورد ژنوتیپ ۱۸ (۶/۲۵ درصد) و یک مورد ژنوتیپ مخلوط ۱۶ و ۳۱ و بقیه ژنوتیپ ۱۶ (۹۳/۷۵ درصد) تشخیص داده شد.

از مجموع ۳۵ مورد دیسپلازی خفیف، ۱۰ مورد (۲۸/۶ درصد) HPV مثبت و ۲۵ مورد (۷۱/۴ درصد) HPV منفی بودند. از تعداد ۲۶ مورد دیسپلازی متوسط، ۹ مورد (۳۴/۶ درصد) HPV مثبت و ۱۷ مورد (۶۵/۴ درصد) HPV منفی بودند. یک مورد هم دیسپلازی شدید با HPV مثبت وجود داشت. در این مطالعه، از تعداد ۲۰ نمونه SCC، ۱۲ مورد (۶۰ درصد) HPV مثبت و ۸ مورد (۴۰ درصد) HPV منفی بودند (جدول ۱). نمونه مخلوط از دو ژنوتیپ ۱۶ و ۳۱ مربوط به بیماری از گروه دیسپلازی متوسط با سن ۳۰ سال بود.

با استفاده از بایگانی پرونده‌های سیتولوژی- پاتولوژی و پرونده بستری بیماران، میانگین سنی افراد مورد بررسی ۴۳/۰۹ سال با انحراف معیار ۱۳/۵۲ سال به دست آمد. جوان‌ترین فرد، ۲۲ سال و مسن‌ترین آن‌ها ۷۶ سال سن داشتند. بیشترین افراد در گروه سنی ۳۹-۳۰ سال و سپس ۵۹-۵۰ سال قرار داشتند. در مقایسه بین شدت دیسپلازی و وضعیت HPV (مثبت یا منفی بودن آن) رابطه معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بین نوع ضایعه (دیسپلازی و SCC) و وضعیت HPV (مثبت یا منفی بودن آن) رابطه وجود داشت و در بیماران با تشخیص SCC، میزان مثبت بودن HPV نسبت به دیسپلازی بیشتر بود (P>۰/۰۵).

میانگین و انحراف معیار سن در افراد HPV مثبت، ۲/۶۲ ± ۴۰/۵۹ سال و در افراد HPV منفی، ۲/۳۴ ± ۴۴/۶۱ سال بود و این اختلاف سن از نظر آماری معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵).

میانگین و انحراف معیار سن در مبتلایان به SCC، ۲/۷۹ ± ۳۵/۳۶ سال و در مبتلایان به دیسپلازی، ۲/۰۱ ± ۴۴/۸۹ سال بود. اختلاف سن بین افراد با تشخیص SCC و دیسپلازی معنی‌دار بود و افراد با SCC از سن کمتری برخوردار بودند (P<۰/۰۵). میانگین و انحراف معیار سن در افراد با دیسپلازی خفیف ۲/۶۴ ± ۴۴/۲۰ سال و در افراد با دیسپلازی متوسط و شدید ۳/۰۱ ± ۴۵/۶۰ سال بود و بین دو گروه، از این حیث اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۱. *فراوانی HPV در انواع دیسپلازی و اسکواموس سل کارسینوما و نوع ژنوتیپ آنها در نمونه های پاپ اسمیر*

تشخیص		HPV+	HPV-	HPV16	HPV18	مجموع
Dysplasia	خفیف	۱۰ (٪۲۸/۶)	۲۵ (٪۷۱/۴)	۱۰	۰	۳۵
	متوسط	۹ (٪۳۴/۶)	۱۷ (٪۶۵/۴)	۸	۱	۲۶
	شدید	۱ (٪۱۰۰)	۰	۱	۰	۱
SCC		۱۲ (٪۶۰)	۸ (٪۴۰)	۱۱	۱	۲۰
جمع		۳۲	۵۰	۳۰	۲	۸۲

SCC: Squamous Cell Carcinoma

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

این مطالعه برای اولین بار در شهر کرمان با تعداد نمونه زیاد ضمن بررسی فراوانی موارد دیسپلازی و سرطانی نمونه‌های پاپ‌اسمیر با دو روش مبتنی بر DNA اقدام به تعیین فراوانی و نوع ژنوتیپ ویروس پاپیلومای انسانی نمود. این بررسی نشان داد که از بین ۲۰۰۰۰ نمونه غربالگری شده، ۸۲ نمونه یعنی حدود ۰/۵ درصد در معرض ابتلا به سرطان گردن رحم بودند که این مسأله بیانگر کم بودن موارد این سرطان در کرمان است (۱۹).

سرطان مهاجم دهانه رحم به طور تقریبی ۱/۶ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان و ۱۵ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان‌های دستگاه تناسلی آنان را به خود اختصاص می‌دهد؛ اما به دلیل دارا بودن یک دوره طولانی قبل از تهاجم، در دسترس بودن برنامه غربالگری مناسب و درمان مؤثر ضایعات اولیه، به عنوان یک سرطان قابل پیشگیری شناخته شده است (۲).

گزارشی از دانشگاه واشنگتن به بررسی میزان احتمالی شیوع سرطان دهانه رحم و مرگ ناشی از آن همچنین تغییرات آن از سال ۱۹۸۰ تا ۲۰۱۰ در مناطق مختلف جهان پرداخته است. این گزارش نشان می‌دهد که مرگ و میر ناشی از این سرطان در ایران سالانه ۰/۳ درصد کاهش داشته است؛ در حالی که در دیگر کشورهای منطقه، افزایش سالانه سرطان مشاهده شده است (۱۹).

آمار ۳۹ درصدی از تأیید حداقل یکی از ژنوتیپ‌های HPV هم نشان دهنده نقش مؤثر این ویروس در ایجاد سرطان گردن رحم است که با مطالعه سایر همکاران در سایر مناطق، اختلافاتی مشاهده می‌گردد؛ به‌طوری که در اروگوئه ۹۲/۶ درصد (۱۷)، سودان ۹۴ درصد (۱۶)، تهران ۶۰ درصد (۸)، بوشهر ۵/۵ درصد (۹) و زابل بین ۲۹ تا ۳۷/۹ درصد (۱۰) گزارش شده است.

HPV غالب در این مطالعه HPV۱۶ بود که با نتایج مطالعات اروگوئه (۱۷) و بوشهر (۹) تا حدودی مطابقت دارد، اما با مطالعات سودان (۱۶) و موزامبیک (۱۴) مخالف است. مخلوط از دو یا چند عفونت همزمان نیز در سایر مطالعات تأیید شده است (۸، ۲). ژنوتیپ‌های جدا شده در این مطالعه، اغلب ژنوتیپ‌های شایع در دنیا یعنی HPV۱۶ و HPV۱۸ بود (۲۰، ۱۰). نکته جالب و منحصر به فرد در این مطالعه، پیدا شدن ژنوتیپ‌های مخلوط ۱۶ و ۳۱ می‌باشد.

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که شیوع ژنوتیپ‌های مختلف در مناطق مختلف دنیا متفاوت است که این موضوع نشان از اهمیت بررسی اپیدمیولوژی منطقه‌ای HPV دارد. به عنوان مثال، Sturegard و همکاران (۱۶) در سودان ۶۲ درصد ژنوتیپ ۶ و ۱۳ درصد ژنوتیپ ۱۶ و ۱۰ درصد ژنوتیپ ۱۱ را داشته‌اند (۱۶)؛ در حالی که مطالعه‌ای مشابه در اروگوئه، ۶۷/۶ درصد ژنوتیپ ۱۶، ۸/۵ درصد ژنوتیپ ۱۸، ۶/۸ درصد ژنوتیپ ۴۵ و ۳۱ درصد ژنوتیپ ۳۳ را داشته‌اند (۱۷). در ایران مطالعه غفاری و همکاران در دو بیمارستان امام خمینی و میرزا کوچک خان در تهران بیشترین ژنوتیپ‌ها HPV۱۶ (۷۵ درصد) و HPV۱۸ (۱۲/۷ درصد) بوده است (۸).

این نتایج در مقایسه با نتایج سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بررسی مولکولار در تعیین ژنوتیپ باعث تصمیم‌گیری صحیح در تشخیص دقیق‌تر و مدیریت بیمار در مصرف دارو و همچنین پیش‌آگهی بیماری می‌شود (۱۲، ۵، ۴). همچنین نتایج مولکولار این مطالعه به جهت اختلاف ژنوتیپ جدا شده با بعضی از مطالعات، تأیید می‌نماید که بررسی مولکولار منطقه‌ای در تعیین ژنوتیپ و تعریف بهتری از اپیدمیولوژی بیماری، نقش مؤثری در مشخص کردن وضعیت حیاتی بیماران با توجه به نوع ژنوتیپ دارد.

مطالعات مشابه نیز مؤید این مطلب است که با وجود این که نقش عفونت HPV۱۸ به عنوان عامل پر خطر، مسجل شده است؛ اما در کل، نسبت به HPV۱۶ میزان خطر کمتری را به خود اختصاص می‌دهد. مطالعه Castellsague و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران در موزامبیک نشان داده است که ممکن است در نواحی و جمعیت‌های مختلف، تفاوت‌هایی بین ژنوتیپ‌های ویروس پاپیلومای انسانی وجود داشته باشد. در این زمینه، گزارش شیوع بالای تیتراسیون ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ در ناقلان هاپلوتایپ اختصاصی HLA DRB1-DQB1 قابل ملاحظه است (۱۴).

طی یک مطالعه مورد- شاهدی در مکزیکوسیتی، واریان‌های آسیایی- آمریکایی و اروپایی HPV۱۶ و خطر آن در مورد سرطان سرویکس بررسی شده است. در نهایت، نتیجه به دست آمده حکایت از آن دارد که شیوع بالای واریان‌های HPV۱۶ آسیایی- آمریکایی که به نظر می‌رسد از واریان‌های اروپایی آنکوژنیک‌تر باشند، علت بالای بروز سرطان سرویکال در مکزیک است (۲۱).

با توجه به این که سرطان دهانه رحم به طور معمول بعد از یک دوره ۱۰ تا ۱۲ ساله روی می‌دهد، از این‌رو HPV به‌عنوان عفونتی که در میانسالی روی می‌دهد، شناخته شده است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان شیوع HPV در نمونه‌های گروه سنی ۳۰ تا ۶۰ سال به طور تقریبی ۷۲ درصد می‌باشد؛ در حالی که در بسیاری از دیگر کشورها به طور معمول، بیشترین میزان شیوع این ویروس در گروه‌های سنین پایین‌تر مشاهده می‌گردد. این تفاوت با شروع فعالیت جنسی مربوط است. در ایران به طور معمول شروع روابط جنسی با ازدواج توأم است و اغلب بین ۳۰-۲۰ سال اتفاق می‌افتد، اما در جوامع غربی به طور معمول فعالیت‌های جنسی بعد از بلوغ شروع می‌شود. در سرطان سرویکس، متاپلازی سلول‌های اپتلیوم ایجاد می‌شود و خطر انتقال و آلودگی در جامعه وجود دارد. عفونت‌های مخفی به طور تقریبی در ۱۰ درصد از افراد دارای فعالیت جنسی دیده می‌شود. آلودگی، بیشتر به عواملی مانند سن ازدواج، سطح فرهنگی، رفتار و فعالیت جنسی غیرمعمول، مصرف دخانیات، عفونت ناحیه ژنیتال و غیره بستگی دارد.

بررسی با روش‌های مبتنی بر DNA این امکان را ایجاد می‌کند که در بیش از ۹۰ درصد از موارد آلودگی شناسایی شود. در روش غربالگری یا آزمایش پاپ‌اسمیر، امکان بروز پاسخ‌های منفی کاذب به میزان بالا وجود دارد. امروزه روش‌های ThinPrep و Bethesda system نیز پیشنهاد گردیده است. نتیجه این که استفاده از روش‌های اختصاصی ردیابی DNA ویروس در تشخیص سرطان سرویکس و تعیین ژنوتیپ آلوده کننده، مفید است. به علاوه این که با این تکنیک‌ها می‌توان انواع مختلف ویروس را در افراد بیمار و حتی به ظاهر سالم نیز شناسایی نمود و بهره گرفتن از این سیستم، می‌تواند به مطالعات اپیدمیولوژی ویروس در جامعه کمک بزرگی بنماید.

از محدودیت‌های این مطالعه، نبود نمونه تازه از پاپ‌اسمیر به‌صورت مایع و یا تراشه‌های بافت می‌باشد. این مسأله باعث محدودیت در استخراج DNA و کاهش کمی و کیفی DNA گردید. همچنین به دلیل قدیمی بودن پرونده بعضی بیماران اطلاعات مربوط به سن تعدادی از بیماران در دسترس نبود که با استفاده از آزمون‌های آماری و شواهد کلی از سنین بیماران مراجعه کننده، این محدودیت بر طرف گردید.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، شیوع عفونت HPV در بین زنان دچار سرطان سرویکس نسبت به سایر کشورها دارای شیوع کمتری می‌باشد؛ اگر چه لازم است مطالعاتی با حجم نمونه بیشتر در تمام مناطق ایران و کشورهای خاور میانه جهت رسیدن به این فرضیه انجام پذیرد. در هر صورت، لازم است در بین زنان ایرانی از همان سنین جوانی با انجام آموزش و تشویق به انجام دادن پاپ‌اسمیر به عنوان تشخیص زودرس در بیماران، توسط مسؤولین وزارت

Archive of SID
www.SID.ir

بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تمهیدات لازم در نظر گرفته شود و آزمایشات تشخیصی مبتنی بر DNA با هزینه‌های کمتری بهینه گردد تا بتوان در بیماران مشکوک، این آزمایشات را همراه با آزمایش پاپ‌اسمیر به‌طور معمول انجام داد.

References

1. Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ* 2007; 85(9): 719-26.
2. Trottier H. Epidemiology of mucosal human papillomavirus (HPV) infections among adult and children. In: Broeck DV, editor. Human papillomavirus and related diseases - from bench to bedside - a clinical perspective. Kraljevica, HR: InTech; 2012. p. 3-18.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur HH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
4. Broeck DV. Human papillomavirus and related diseases - from bench to bedside - a clinical perspective. Kraljevica, HR: InTech; 2012. p. 203-43.
5. Broeck DV. Human papillomavirus and related diseases - from bench to bedside - a clinical perspective. Kraljevica, HR: InTech; 2012. p. 249-90.
6. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH, Pang MG. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine pap smear of 2,470 Korean women determined by DNA chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(12): 2153-6.
7. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2006; 103(1): 12-7.
8. Ghaffari SR, Sabokbar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensani F, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cervical cytology in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(4): 529-32.
9. Zandi K, Eghbali SS, Hamkar R, Ahmadi S, Ramedani E, Deilami I, et al. Prevalence of various human papillomavirus (HPV) genotypes among women who subjected to routine Pap smear test in Bushehr city (south west of Iran) 2008-2009. *Virol J* 2010; 7: 65.
10. Shahramian I, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Moradi A, Forghani F. Prevalence of HPV Infection and High Risk HPV Genotypes (16, 18), among Monogamous and Polygamous Women, In Zabol, Iran. *Iran J Public Health* 2011; 40(3): 113-21.
11. Moyer VA. Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2012; 156(12): 880-91, W312.
12. Broeck DV. Human papillomavirus and related diseases - from bench to bedside - a clinical perspective. Kraljevica, HR: InTech; 2012. p. 163-202.
13. Sebbelov AM, Davidson M, Kruger KS, Jensen H, Gregoire L, Hawkins I, et al. Comparison of human papillomavirus genotypes in archival cervical cancer specimens from Alaska natives, Greenland natives and Danish Caucasians. *Microbes Infect* 2000; 2(2): 121-6.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, Kornegay JR, dos Santos F, Gomez-Olive FX, et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. *Lancet* 2001; 358(9291): 1429-30.

15. Mills A, Balasubramaniam R, Longacre TA, Kong CS, Pinsky BA. Laboratory-developed L1 sequencing and type-specific, real-time polymerase chain reaction for the detection and typing of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(1): 50-4.

16. Sturegard E, Johansson H, Ekstrom J, Hansson BG, Johnsson A, Gustafsson E, et al. Human papillomavirus typing in reporting of condyloma. *Sex Transm Dis* 2013; 40(2): 123-9.

17. Berois N, De CP, Mazal D, Sica A, Cedeira M, Caserta B, et al. Prevalence and distribution of high-risk human papillomavirus genotypes in invasive carcinoma of the uterine cervix in Uruguay. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23(3): 527-32.

18. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1): S43-S51.

19. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2011; 378(9801): 1461-84.

20. Mortazavi S, Zali M, Raoufi M, Nadji M, Kowsarian P, Nowroozi A. The Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3(1): 69-72.

21. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 315-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Frequency of Dysplastic and Cancerous Pap Smear and Genotyping of Human Papillomavirus by DNA Probetechniques in Kerman, Iran

Monsefi N., M.D.[1], Dabiri Sh., M.D.[2,3*], Abbaszadeh M., M.D.[4], Safizadeh H., M.D.[5], Fotouhi-Ardakani R., M.Sc.[6], Amirpur–Rostami S., M.D.[7], Kamyabi Z., M.D.[8], Ashraf Ganjoei T., M.D.[8], Eftekhari N., M.D.[8], Modarresnejad V., M.D.[8], Habibzadeh V., M.D.[9], Naderi T., M.D.[8], Mirzaei F., M.D.[10]

1. Assistant Professor, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Professor, Department of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4. Resident of Pathology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5. Associate Professor, Department of Community Medicine, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
6. PhD Student of Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran and Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
7. Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
8. Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
9. Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
10. Associate Professor of Obstetrics and Gynecology, Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; Email: dabiri12@yahoo.com

(Received: 28 Dec. 2012 Accepted: 7 March 2013)

Abstract

Background & Aims: Around the world, cervical cancer is the second most common cancer in women. Today, screening programs have reduced morbidity and mortality rates of this disease. Epidemiological and molecular studies have shown that certain types of the human papillomavirus are carcinogen types and the primary cause of cervical cancer. HPV type 16 and 18 are the most common high-risk types. In this study, frequency of different HPV genotypes in women who referred for a routine visit to an outpatient clinic of Kerman University of Medical Sciences, Iran, has been obtained by DNA probe technique.

Methods: Our study is a cross-sectional, analytic study on 20000 Pap smear samples over four consecutive years among women in reproductive ages (15-50 years) referred to University centers and private institutions in Kerman, Iran. All samples were collected in the laboratory of Afzalipour, and Bahonar Hospitals, and private institutions. The typical samples of dysplasia and cancer were reviewed by two pathologists and a pathology assistant according to the World Health Organization standards. The samples were examined after DNA extraction and molecular DNA probe technique.

Results: 62 cases of 82 Pap smear samples were dysplastic and 20 samples were diagnosed as squamous cell carcinoma (SCC). Moreover, 20 cases (32.2%) of dysplastic Pap smears and 12 cases (60%) of SCC samples were HPV positive. A total of 32 patients (39%) were positive for HPV. Of all samples only two were genotype 18 (25.6%), one was a mixture of 16 and 31 genotypes, and the remaining were all genotype 16 (93.75%). In the comparison between dysplasia severity (mild, moderate, and severe) and the HPV status (+ or -), and also the relation between age and status of HPV and the severity of dysplasia no relations were found. However, there was a significant relation between detection (dysplasia, SCC) and the HPV status, and also the relation between age and type of lesion diagnosis.

Conclusion: Based on the findings of our study and the Iranian culture, prevalence of HPV infection among women with cervical cancer is less common than in other countries. HPV type 16, which is a carcinogenic genotype, was the predominant genotype.

Keywords: HPV genotyping, Pap smear, Dysplastic, DNA probe, Iran, Squamous cell carcinoma (SCC), Cervical cancer

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(5): 450-459

Archive of SID

www.SID.ir