

مطالعه ارتباط بین پاپیلوما ویروس انسانی و سرطان پروستات با روش های ایمونوهیستوشیمی و PCR در بیمارستان های اهواز

افسون شریعت^{۱*}، پرستو ارزانی^۲، معصومه شیرالی^۲

چکیده

زمینه و هدف: ژنوتیپ های پرخطر پاپیلوما ویروس انسانی (*Human papillomavirus, HPV*) با القاء تغییراتی در اپیتلیوم پروستات منجر به سرطان پروستات می شوند. هدف از این مطالعه، شناسایی ارتباط بین عفونت *HPV* و سرطان پروستات با روشهای ایمونوهیستوشیمی (*Immunohistochemistry, IHC*) و *PCR* (*Polymerase chain reaction*) در بیمارستان های اهواز بود. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۵۰ نمونه پارافینه بافتی پروستات از بایگانی آزمایشگاه های پاتولوژی بیمارستان های اهواز در سال ۹۸ جمع آوری گردید. ۲۵ نمونه بافتی از بیماران با سرطان پروستات و ۲۵ نمونه دیگر از بیماران با هیپرپلازی خوش خیم پروستات (کنترل) انتخاب شد. با روش های *IHC* و *PCR* عفونت *HPV* در نمونه ها تشخیص داده شد.

یافته ها: آنکو پروتئین *HPV E7* در ۴ (۱۶٪) نمونه سرطان پروستات توسط *IHC* بیان گردید. با روش *PCR* ژن *LI* ویروسی در همان ۴ (۱۶٪) نمونه سرطان پروستات شناسایی گردید و ژن *HPV E7* نیز در همان نمونه های سرطانی تشخیص داده شد. بین عفونت *HPV* و سرطان پروستات ارتباط معناداری وجود داشت ($P=0.03$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج، عفونت *HPV16* نقش مهمی در توسعه سرطان پروستات در بیمارستان های اهواز دارد. بعلاوه، روش *IHC* میتواند جهت تشخیص آنکو پروتئین های *HPV* در بیماران سرطان پروستات بکار رود و این تکنیک را میتوان جایگزین روش *PCR* نمود.

واژگان کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی، سرطان پروستات، ایمونوهیستوشیمی، *PCR*، بیمارستان های اهواز.

۱-استادیار گروه میکروب شناسی.

۲-دانشجوی دکتری گروه میکروب شناسی.

۱-گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

* نویسنده مسئول:

افسون شریعت؛ گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۷۳۳۰۸۴۰۲

Email: afsoonsh1980@yahoo.com

مقدمه

بیش از ۵۰٪ از نمونه های سرطان پروستات گزارش شده است (۱۳). در این مطالعه، ارتباط بین پاپیلوما ویروس انسانی و سرطان پروستات با روش های ایمونوهیستوشیمی و PCR در بیمارستان های اهواز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

بیماران مورد مطالعه

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، بلوک های پارافینه ۲۵ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۲۵ بیمار دارای هیپرپلازی خوش خیم پروستات مراجعه کننده به بیمارستان های گلستان و امام خمینی (ره) اهواز در بازه زمانی اردیبهشت ماه تا مهر ماه ۱۳۹۸ جمع آوری گردید. پس از بررسی های مجدد توسط پاتولوژیست، همه نمونه ها از لحاظ بافت شناسی تأیید شدند.

معیارهای ورود به مطالعه شامل بلوک های بیماران مبتلا سرطان پروستات و هیپرپلازی خوش خیم پروستات بود که اطلاعات کاملی در مورد سن و درجه هیستوپاتولوژیکی داشتند و معیار خروج از مطالعه شامل بلوک های فاقد اطلاعات بود. ویژگی های نمونه های بافتی بیماران در جدول (۱) آمده است. این مطالعه در کمیته ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی کازرون با شناسه اخلاق: IR.IAU.KAU.REC.1398.117 مورد تأیید قرار گرفت.

روش ایمونوهیستوشیمی

از ۵۰ بلوک پارافینه توسط میکروتوم (Leitz, Germany) سکشن هایی با ضخامت ۵ میکرومتر روی اسلاید تهیه شد و جهت بررسی بیان پروتئین E7 پاپیلوما ویروس با روش ایمونوهیستوشیمی، کیت Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB (Dako, Denmark) مورد استفاده قرار گرفت.

سرطان پروستات رایجترین سرطان در مردان در سراسر جهان می باشد (۱). سابقه خانوادگی، افزایش سن، رژیم غذایی و عوامل محیطی در ایجاد این سرطان دخالت دارند (۲). بیماری های منتقل شده از طریق جنسی ممکن است نقش مهمی در شروع سرطان پروستات داشته باشند (۳). ویروس پاپیلوما انسانی (Human papillomavirus, HPV) یکی از رایجترین عوامل عفونی انتقال یافته از طریق جنسی است (۴). این ویروس یک ویروس کوچک فاقد پوشش با DNA حلقوی دو رشته ای متعلق به خانواده پاپووا ویریده می باشد (۵).

عفونت ویروس پاپیلوما انسانی می تواند سبب التهاب پروستات شده و شواهد نشان می دهد التهاب مزمن در بروز سرطان پروستات دخالت دارد (۶). سرطان زایی HPV در بافت انسانی اثبات شده است. خاصیت تومورزایی ویروس بدلیل ایجاد عفونت پایدار و بیان دو پروتئین ویروسی E6 و E7 بوده که بترتیب مهار کننده پروتئین های سرکوبگر تومور در انسان از قبیل: رتینوبلاستوما (Retinoblastoma, Rb) و p53 می باشند (۷). پروتئین های تومورزای E6/E7 در HPV سبب نامیرا شدن سلول های اپیتلیال پروستات می شوند (۸). اتصال پروتئین HPV E7 به Rb منجر به تجزیه این پروتئین تنظیم کننده سلولی، از دست رفتن یکی از نقاط کنترل چرخه سلولی و پیشروی سلول به سمت بدخیمی می گردد (۹).

اولین بار McNicol و همکاران در سال ۱۹۹۰ حضور DNA ویروسی را در بافت های پروستات بیماران با روش شناسایی کردند (۱۰). در تحقیقی Yang و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند خطر بروز سرطان پروستات طی عفونت با HPV افزایش می یابد (۱۱). مطالعات زیادی ارتباط بین عفونت HPV و سرطان پروستات را نشان می دهد (۱۲). عفونت با HPV های پرخطر از قبیل HPV16 و HPV18 در

بررسی شدند (۱۶). این پرایمرها توالی های حفظ شده در ژن *LI* ویروسی (کد کننده پروتئین کپسیدی) را هدف قرار داده و قادرند طیف وسیعی از انواع *HPV* را شناسایی نمایند (۱۶). مخلوط واکنش برای *PCR* با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی: ۱۰ میکرولیتر *Master mix*، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۵ میکرولیتر *DNA* الگو و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه بود.

برنامه تکثیر *PCR* برای پرایمرهای عمومی شامل: یک سیکل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۵ دقیقه بود که بدنبال آن ۳۰ سیکل واسرشت در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۴۸ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، طولیل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۱ دقیقه و طولیل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۵ دقیقه انجام شد.

همچنین جهت شناسایی ژنوتیپ *HPV* های پرخطر، روش *PCR* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تیپ برای ژن *HPV16 E7*: 5'ATA TAT GTT : 3'AGA TTT GCA ACC AGA GAC AAC 3' و 5'GTC TAC GTG TGT GCT TTG TAC و 3'GCA C 3' با اندازه ۱۹۶ جفت باز و پرایمر اختصاصی تیپ برای ژن *HPV18 E7*: 5'CCG : 3'AGC ACG ACA GGA GAG GCT 3' و 5'TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG 3' با اندازه ۱۷۲ جفت باز انجام گردید (۱۷). برنامه تکثیر *PCR* برای پرایمرهای اختصاصی شامل: یک سیکل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس بمدت ۵ دقیقه بود که بدنبال آن ۳۰ سیکل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۶ درجه سلسیوس بمدت ۳۰ ثانیه، طولیل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۴۰ ثانیه و طولیل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

محصولات *PCR* در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیم برامید قابل مشاهده

همانطور که در مطالعه پیشین ذکر گردید، ابتدا اسلایدها با محلول های زایلن و اتانل پارافین زدایی شدند (۱۴). سپس جهت سرکوب فعالیت پراکسیداز داخلی، اسلایدها در محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ و متانول انکوبه گردیدند. پس از شستشوی آنها با بافر فسفات، باندهای غیراختصاصی با افزودن سرم نرمال بزی به اسلایدها غیرفعال شدند (۱۴). جهت تشخیص پروتئین *E7* در نمونه های بافتی، اسلایدها توسط تکنیک استرپ آویدین-بیوتین پراکسیداز با آنتی بادی منوکلنال *E7* (Dako, Denmark) و دی آمینوبنزیدین (Dako, Denmark) بعنوان ماده کروموژن به مدت یک شبانه روز رنگ آمیزی شدند. در نهایت اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. رسوبات قهوه ای رنگ در هسته سلول های عفونی و گاهی سیتوپلاسم نشان دهنده حضور پروتئین ویروسی *E7* می باشد (۱۵).

استخراج *DNA*

ابتدا برش نازکی با ضخامت ۷ میکرومتر از هر بلوک پارافینه تهیه شد. سپس نمونه ها جهت پارافین زدایی با استفاده از زایلن ۱۰۰٪ بمدت ۵ دقیقه انکوبه شدند و توسط اتانل خالص آبدهی گردیدند. در مرحله بعد، استخراج *DNA* ژنومی از نمونه های بافتی توسط کیت ساخت شرکت سیناژن ایران طبق دستورالعمل انجام شد. در نهایت *DNA* استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر بافر *Tris-EDTA* حل شد و غلظت *DNA* با استفاده از دستگاه *NanoDrop* (ThermoScientific, USA) اندازه گیری گردید و تا زمان انجام آزمایش *PCR* در فریزر -۲۰ درجه نگهداری شد (۱۶).

روش ملکولی *PCR*

DNA استخراج شده از نمونه های بافتی، جهت حضور *HPV* در ۵۰ نمونه بافتی با روش مولکولی *PCR* و توسط پرایمرهای عمومی GP5+/6+ : 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' و 5'-GAA AAA TAA ACT GTA

به منظور تایید روش IHC جهت تشخیص HPV در ۵۰ نمونه بافتی بیماران، PCR انجام شد. در همان ۴ نمونه بافتی سرطان پروستات که بیان پروتئین E7 با روش ایمنو هیستوشیمی تأیید شده بود، حضور DNA پاپیلوما ویروس با روش PCR توسط پرایمرهای عمومی اثبات گردید و ژنوم ویروسی در هیچ یک از نمونه های بافتی هیپرپلازی خوش خیم پروستات وجود نداشت. شکل (۲) محصولات PCR بر روی ژل آگارز برای ژن LI پاپیلوما ویروس انسانی را نشان می دهد.

همچنین، الکتروفورز ژل آگاروز محصولات PCR توسط پرایمرهای اختصاصی نشان داد که ۴ نمونه HPV مثبت در نمونه های بافتی سرطان پروستات، پاپیلوما ویروس های پرخطر HPV16 بودند (شکل ۳). لازم به ذکر است ۴ نمونه بافتی سرطان پروستات HPV مثبت، درجه گلیسون بالایی داشتند.

با توجه به تجزیه و تحلیل آماری، بین سرطان پروستات و حضور HPV تفاوت معنی داری بدست آمد ($p=0/03$). در جدول (۲) میزان ارتباط بین حضور HPV و نمونه بیماران با روش های ایمنو هیستوشیمی و PCR نشان داده شده است.

گردیدند (۱۷). DNA ژنومی رده سلولی HeLa حاوی توالی HPV18 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و بعنوان نمونه کنترل مثبت بکار رفت (۱۶). همچنین مخلوط واکنش PCR بدون افزودن DNA الگو (بجای DNA آب مقطر اضافه شد) بعنوان نمونه کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ (SPSS Inc. Chicago, USA) و توسط آزمون-های آماری t-test و کای اسکوئر آنالیز شدند و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

با استفاده از روش ایمنو هیستوشیمی، پروتئین E7 ویروسی بصورت رسوبات قهوه ای رنگ در هسته و سیتوپلاسم سلول ها در ۴ نمونه بافتی (۱۶٪) از سرطان پروستات توسط میکروسکوپ نوری مشاهده گردید که می تواند دلالت بر حضور پاپیلوما ویروس های پرخطر در این نمونه ها باشد (شکل ۱). اما در هیچ یک از نمونه های بافتی هیپرپلازی خوش خیم پروستات، این پروتئین ویروسی مشاهده نشد.

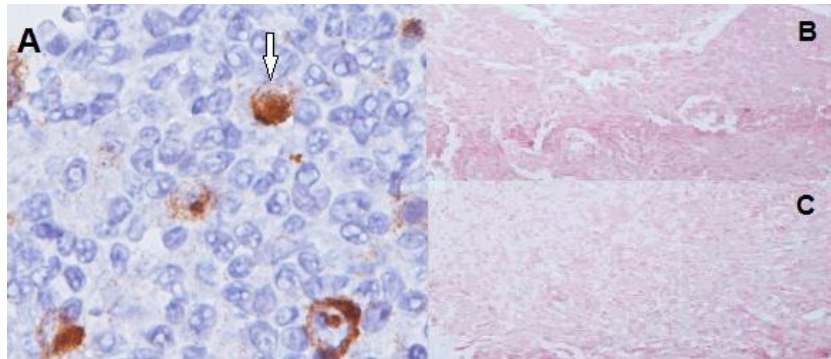
جدول ۱: ویژگی های بیماران مورد مطالعه بیماران

	سرطان پروستات (n= ۲۵)	هیپرپلازی خوش خیم پروستات (n =۲۵)
میانگین سنی (Mean±SD)	۶۵/۴±۸/۰۲	۶۷/۳۶ ± ۲/۴
مرحله		
پاتولوژیکی		
T۱	۰	-
T۲	۱۶	-
T۳	۷	-
T۴	۲	-
درجه گلیسون (Gleason score)		
Gleason ≤ ۶	۱۳	-
Gleason= ۷	۱۱	-
Gleason ≥ ۸	۱	-

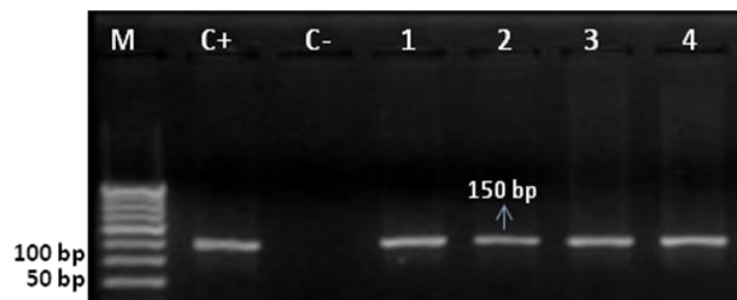
SD: Standard Deviation

جدول ۲: ارتباط بین حضور HPV و نمونه های بیماران

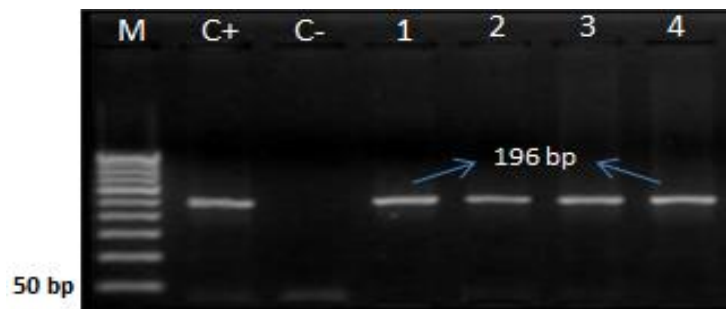
P-value	تعداد (%)	بیماران
۰/۰۳	۴ (۱۶٪)	سرطان پروستات
	۲۱ (۸۴٪)	HPV مثبت
		HPV منفی
-	۰ (۰٪)	هیپرپلازی خوش خیم پروستات
	۲۵ (۱۰۰٪)	HPV مثبت
		HPV منفی



شکل ۱: شناسایی بیان پروتئین *HPV E7* در نمونه های بافتی سرطان پروستات با روش ایمونوهیستوشیمی. (A) همانطور که با فلش مشخص شده رسوبات قهوه ای رنگ حاکی از حضور این پروتئین در سلول ها در نمونه بافتی *HPV* مثبت است. شکل های (B) و (C) نمونه های بافتی فاقد پروتئین *E7* را نشان می دهند.



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصولات *PCR* جهت تشخیص *HPV* توسط پرایمرهای عمومی (۱۵۰ جفت باز)؛ M: مارکر Ladder ۵۰ جفت بازی (CinnaClon, Iran), C+: نمونه کنترل مثبت، C-: نمونه کنترل منفی، چاهک های ۱-۴: نمونه های *HPV* مثبت.



شکل ۳: الکتروفورز ژل آگارز محصولات *PCR* جهت تشخیص *HPV* توسط پرایمرهای اختصاصی (۱۹۶ جفت باز)؛ M: مارکر Ladder ۵۰ جفت بازی (CinnaClon, Iran), C+: نمونه کنترل مثبت، C-: نمونه کنترل منفی، چاهک های ۱-۴: نمونه های *HPV16* مثبت.

عفونت پاپیلوما ویروس انسانی و سرطان پروستات ارتباط معنی داری وجود داشت ($p=0/03$).

اما در مطالعه Aydin و همکاران در سال ۲۰۱۷ تنها ۱/۷٪ از نمونه های سرطان پروستات واجد HPV DNA بودند و ژنوم ویروس در هیچ یک از نمونه های بافتی هیپرپلازی خوش خیم پروستات وجود نداشت (۲۷). همچنین در تحقیقات جداگانه ای که در ایران توسط Jafari و همکاران در سال ۲۰۱۸ و Abdolmaleki و همکاران در سال ۲۰۱۸ بترتیب در شهرهای کرمان و سنجند انجام گرفت، ارتباطی بین پاپیلوما ویروس انسانی و سرطان پروستات مشاهده نشد (۲۸،۱۶).

تفاوت بودن نتایج این مطالعه با تحقیقات پیشین ممکن است دلیل کاربرد روشهای مختلف جهت تشخیص عفونت ویروسی در نمونه های سرطانی، مشکلات تکنیکی این روشها، تفاوت در تشخیص ژنوم HPV و محدودیت هایی از قبیل تعداد کم نمونه های مورد بررسی باشد. بعلاوه، فراوانی و شیوع عفونت HPV در بیماران مبتلا به سرطان پروستات مرتبط با ناحیه جغرافیایی، سن بیمار، وضعیت ایمنی و فاکتورهای ژنتیکی فرد است.

در این مطالعه، ویروس پرخطر HPV16 در ۴ (۱۶٪) نمونه سرطان پروستات جمع آوری شده از بیمارستان های اهواز شناسایی شد. مشابه با این تحقیق، در اکثر مطالعات صورت گرفته نیز HPV های پرخطری نظیر HPV16 و HPV18 در ایجاد سرطان پروستات نقش داشتند (۲۵،۲۹). بهترین راه جهت تشخیص HPV DNA در نمونه های بافتی سرطان پروستات، روش ملکولی PCR می باشد. اما نقطه ضعفی که استفاده از پرایمر عمومی L1 برای شناسایی HPV در نمونه ها دارد، این است که در طی درج HPV درون ژنوم میزبان، اغلب ژن L1 از دست رفته و اکثر نمونه های مثبت بصورت منفی کاذب گزارش می گردند (۳۰).

در این مطالعه حضور HPV در نمونه های بافتی دو گروه از بیماران مبتلا به سرطان پروستات و بیماران با هیپرپلازی خوش خیم پروستات بررسی گردید. پاپیلوما ویروس در ۴ (۱۶٪) نمونه بافتی سرطان پروستات با روش های PCR و IHC تشخیص داده شد. بدلیل مشکل بودن دستیابی به بافت های نرمال پروستات، بافت های هیپرپلازی خوش خیم پروستات بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

عفونت پاپیلوما ویروس به دو روش نامیرا کردن سلولی و ایجاد التهاب مزمن در بروز سرطان پروستات مشارکت دارد (۱۸). بطوریکه این عفونت ویروسی سبب تحریک التهاب مزمن پروستات شده و غده پروستات، بافت های مجاور و سیستم ادراری آلوده میگردند (۲۰،۱۹). عمدتاً غده پروستات بعنوان مخزنی جهت انتقال جنسی پاپیلوما ویروس از طریق مایع سمینال عمل کرده و عفونت مخاط سیستم تناسلی میتواند منجر به تکثیر سلول های مخاطی و ایجاد بدخیمی شود. بدین ترتیب HPV با سرطان پروستات مرتبط می باشد (۲۱،۱۰).

در مطالعات مختلف نتایج متناقضی از وجود ارتباط بین HPV و سرطان پروستات وجود دارد. در تحقیقی Martinez-Fierro و همکاران در سال ۲۰۱۰ شیوع ژنوم ویروسی را در ۲۰٪ از نمونه های سرطان پروستات یافتند (۲۲) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین، بطور مشابهی در تحقیقات جداگانه ای که توسط Medel-Michopoulou و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Flores و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد HPV پرخطر بترتیب در ۱۶٪ و ۱۹٪ نمونه های سرطان پروستات تشخیص داده شد (۲۴،۲۳). در پژوهش های جداگانه ای که توسط Moghoofoei و همکاران در سال ۲۰۱۹ و Atashafrooz و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ایران انجام شد ارتباط مثبت معنی داری بین عفونت HPV و سرطان پروستات بدست آمد (۲۵،۲۶) که با تحقیق حاضر مشابهت دارد. در این مطالعه نیز بین

پروتئین اختصاصی HPV در نمونه های بافتی سرطان پروستات استفاده کرد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق میتوان دریافت که نه تنها روش ملکولی PCR بلکه روش ایمونوهیستوشیمی نیز با حساسیت خوبی قادر به تشخیص HPV در نمونه های بافتی سرطان پروستات می باشد. بنابراین از آنجا که روش ایمونوهیستوشیمی نسبتا سریع و ارزان قیمت است، میتواند جهت شناسایی عفونت پاپیلوما ویروس انسانی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات جایگزین روش PCR گردد تا بتوان به موقع از انتشار این سرطان در مردان پیشگیری نمود.

قدردانی

تحقیق حاضر مستخرج از طرح پژوهشی دانشجویی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون می باشد. بدین وسیله نویسندگان از همکاری کارکنان آزمایشگاه ها و بخش های پاتولوژی بیمارستان های اهواز تشکر و قدردانی به عمل می آورند.

روش ایمونوهیستوشیمی نیز جهت شناسایی آنتی-ژن های اختصاصی ویروسی مؤثر بوده و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می باشد (۳۱). در این مطالعه، پروتئین E7 ویروسی در ۴ (٪۱۶) نمونه سرطان پروستات با روش ایمونوهیستوشیمی شناسایی شد. مشابه با تحقیق حاضر، در مطالعه صورت گرفته توسط Mokhtari و همکاران در سال ۲۰۱۱ در اصفهان ارتباط مثبت معنی داری بین HPV و سرطان پروستات با روش ایمونوهیستوشیمی بدست آمد (۳۱). همچنین در تحقیقی که توسط Pascale و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایتالیا انجام گرفت، پروتئین ویروسی E7 در نمونه های سرطان پروستات با روش ایمونوهیستوشیمی شناسایی شد که با مطالعه حاضر مطابقت داشت (۳۲). بطور مشابهی، در پژوهش انجام شده توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کره در مورد ارتباط HPV با سایر سرطان های دستگاه ادراری از جمله سرطان مثانه نیز پروتئین ویروسی بخوبی با روش ایمونوهیستوشیمی در نمونه های سرطانی تشخیص داده شد (۳۳).

بنابراین باتوجه به هزینه بالا و مهارت زیادی که برای انجام تکنیک PCR لازم است، می توان از روش ساده و نسبتا ارزان ایمونوهیستوشیمی جهت شناسایی

منابع

- 1-Ferlay J, Soerimataran I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86.
- 2-Hoffman RM. Screening for prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011; 365(21): 2013-19.
- 3-Sutcliffe S, Nevin RL, Pakpahan R, Elliott DJ, Cole SR, De Marzo AM, et al. Prostate involvement during sexually transmitted infections as measured by prostate-specific antigen concentration. *Br J Cancer*. 2011; 105(5): 602-5.
- 4-Heidegger I, Borena W, Pichler R. The role of human papilloma virus in urological malignancies. *Anticancer Res*. 2015; 35(5): 2513-19.
- 5-Videla S, Darwich L, Cañadas M, Clotet B, Sirera G. Incidence and clinical management of oral human papillomavirus infection in men: A series of key short messages. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014; 12(8): 947-57.
- 6-Taverna G, Pedretti E, Di Caro G, Borroni EM, Marchesi F, Grizzi F. Inflammation and prostate cancer: Friends or foe. *Inflamm Res*. 2015; 64(5): 275-86.
- 7-Mokhtari M, Taghizadeh F, Hani M. Is prostatic adenocarcinoma in a relationship with Human Papilloma Virus in Isfahan -Iran. *J Res Med Sci*. 2013; 18(8): 707-10.
- 8-Chen AC, Waterboer T, Keleher A, Morrison B, Jindal S, McMillan D, et al. Human papillomavirus in benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma patients. *Pathol Oncol Res*. 2011; 17(3): 613-17.
- 9-Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015; 7(7): 3863-90.

- 10-McNicol PJ, Dodd JG. Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(3): 409-12.
- 11-Yang L, Xie S, Feng X, Chen Y, Zheng T, Dai M, et al. Worldwide prevalence of human papillomavirus and relative risk of prostate cancer: A metaanalysis. *Sci Rep.* 2015; 5: 14667.
- 12-Ramezani A, Banifazl M, Eslamifar A, Aghakhani A. Association between human papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Iranian J Pathol.* 2011; 6(1): 3-7.
- 13-Al-Maghrabi JA. The role of human papillomavirus infection in prostate cancer. *Saudi Med J.* 2007; 28(3): 326-33.
- 14-Shariat A. Detection of LMP1 protein in Breast Cancer tissue samples from Fars province hospitals. *Iran J Med Microbiol.* 2017; 11(1): 67-74.
- 15-Lee HS, Lee JH, Choo JY, ByunHJ, Jun JH, Lee JY. Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction for Detection Human Papilloma Virus in Warts: A Comparative Study. *Ann Dermatol.* 2016; 28(4): 479-85.
- 16-Abdolmaleki N, Khodabandehloo M, Ramezanzadeh R, Roshani D. No Association Between Human Papillomavirus and Prostate Cancer. *Int J Cancer Manag.* 2018; 11(4): e10049.
- 17-Lesninkova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. Rapid, sensitive, type specific PCR detection of the E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 from paraffin embedded sections of cervical carcinoma. *Infect Agent Cancer.* 2010; 5:2.
- 18-Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014; 15(3): 266-82.
- 19-Guma S, Malglantay R, Lau R, Wiczorek R, Melamed J, Deng FM, et al. Papillary urothelial carcinoma with squamous differentiation in association with human papiloma virus: case report and literature review. *Am J Clin Exp Urol.* 2016; 4(1):12-16.
- 20-Tolstov Y, Hadaschik B, Pahernik S, Hohenfellner M, Duensing S. Human papillomaviruses in urological malignancies: A critical assessment. *Urol Oncol.* 2014; 32(1): 46.e19-27.
- 21-Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res.* 1998; 26(3): 165-9.
- 22-Martinez-Fierro ML, Leach RJ, Gomez-Guerra LS, Garza- Guajardo R, Johnson-Pais T, Beuten J, et al. Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer. *BMC Cancer.* 2010; 10: 326.
- 23-Michopoulou V, Derdas SP, Symvoulakis E, Mourmouras N, Nomikos A, Delakas D, et al. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA prevalence and p53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism in prostate cancer in a Greek group of patients. *Tumour Biol.* 2014; 35(12): 12765-73.
- 24-Medel-Flores O, Valenzuela-Rodríguez VA, Ocadiz-Delgado R, Castro-Muñoz LJ, Hernández-Leyva S, Lara-Hernández G, et al. Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genetics and Molecular Biology.* 2018; 41(4): 781-9.
- 25-Moghoofei M, Keshavarz M, Ghorbani S, Babaei F, Sadri Nahand J, Tavakoli A, et al. Association between human papillomavirus infection and prostate cancer: A global systematic review and meta-analysis. *Asia-Pac J Clin Oncol.* 2019; 15(5): e59-e67.
- 26-Atashafrooz F, Rokhbakhsh-Zamin F. Frequency and Type Distribution of Human Papilloma Virus in Patients with Prostate Cancer, Kerman, Southeast of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(8): 3953-8.
- 27-Aydin M, Bozkurt A, Cikman A, Gulhan B, Karabakan M, Gokce A, et al. Lack of evidence of HPV etiology of prostate cancer following radical surgery and higher frequency of the Arg/Pro genotype in turkish men with prostate cancer. *IBJU.* 2017; 43 (1): 36-46.
- 28-Jafari E, Dabiri S, Mortazaeizadeh A, Sayadi AR, Amir Poor Rostami S. Non – Detection of HPV DNA in Prostatic Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia: a case- control study in Kerman. *J Kerman Univ Med Sci.* 2018; 25(1): 77-83.
- 29-Bae J-M. Human papillomavirus 16 infection as a potential risk factor for prostate cancer: an adaptive meta-analysis. *Epidemiol Health.* 2015; 37: e2015005.
- 30-Naryshkin S, Austin RM. Limitations of widely used high-risk human papillomavirus laboratory developed testing in cervical cancer screening. *Drug Health Patient Saf.* 2012; 4: 167-72.
- 31-Mokhtari M, Taghizadeh F, Rouzbahani E, Narimani T. Comparison of Relative Frequency of Human Papillomatous Virus by Using of Immunohistochemistry Method between Patients with Prostatic Adenocarcinoma or Benign Prostatic Hyperplasia. *J Isfahan Med Sch.* 2011; 29(127): 80-5.
- 32-Pascale M, Pracella D, Barbazza R, Marongiu B, Roggero E, Bonin S, et al. Is Human Papillomavirus Associated with Prostate Cancer Survival. *Disease markers.* 2013; 35(6): 607-13.
- 33-Kim SH, Joung JY, Chung J, Park WS, Lee KH, Seo HK. Detection of Human Papillomavirus Infection and p16 Immunohistochemistry Expression in Bladder Cancer with Squamous Differentiation. *PLoS ONE.* 2014; 9(3): e93525.

Studying the Association between *Human Papillomavirus* and Prostate Cancer by Immunohistochemistry and PCR Techniques among Patients in Ahvaz Hospitals

Afsoon Shariat^{1*}, Parastoo Arzani², Masoumeh Shirali²

1-Assistant Professor of Microbiology.

2-Ph.D Student of Microbiology.

1,2-Department of Microbiology,
 Faculty of Basic Sciences, Kazerun
 Branch, Islamic Azad University,
 Kazerun, Iran.

*Corresponding author:

Afsoon Shariat; Department of
 Microbiology, Faculty of Basic
 Sciences, Kazerun Branch, Islamic
 Azad University, Kazerun, Iran.
 Tel: +989173308402
 Email: afsoonsh1980@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: High risk genotypes of *Human Papillomavirus (HPV)* induce proliferative changes in prostate epithelium that result prostate cancer. The aim of this study was to assess the association of *HPV* infection with prostate cancer using immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) techniques among patients in Ahvaz hospitals.

Subjects and Methods: In this cross-sectional study, 50 paraffin embedded and formalin fixed prostate tissues were collected from the archive of pathology laboratories, Ahvaz Hospitals in 2019. A total of 25 tissues with diagnosis of prostate cancer and 25 tissues with benign prostatic hyperplasia (controls) were selected. *HPV* detection was performed by Immunohistochemistry (IHC) and PCR methods.

Results: *HPV E7* oncoprotein was positively expressed in 4/25 (16%) prostate cancer specimens by IHC. *HPV L1* gene was identified in 4/25 (16%) prostate cancer samples by PCR. Also, *HPV16 E7* gene was detected in the same cancer specimens. Correlation between *HPV* infection and prostate cancer was significant ($P = 0.03$).

Conclusions: According to these results, *HPV16* infection plays an important role in prostate cancer development among prostate cancer patients in Ahvaz hospitals. Furthermore, IHC method can be used for the detection of *HPV* oncoproteins in prostate cancer patients and this technique is as an alternative method for PCR.

Keywords: *Human Papillomavirus*, Prostate cancer, Immunohistochemistry, PCR, Ahvaz hospitals.

► Please cite this paper as:

Shariat A, Arzani P, Shirali M. Studying the Association between *Human Papillomavirus* and Prostate Cancer by Immunohistochemistry and PCR Techniques among Patients in Ahvaz Hospitals. *Jundishapur Sci Med J* 2020; 19(4):425-434

Received: May 2, 2020

Revised: Aug 26, 2020

Accepted: Sep 7, 2020