

## تعیین انواع گونه های پاپیلوما ویروس انسانی در سرطان های اپیتلیائی سر و گردن در بخش گوش و حلق و بینی بیمارستان امام خمینی (ره) اهواز با روش PCR

دکتر سهیلا نیک اخلاق\*، دکتر نادر صاکی\*\*، دکتر منوچهر مکوندی\*\*\*، دکتر جوانه جهانشاهی\*\*\*\*  
دکتر نپتون عماد مستوفی\*\*\*\*\*

دریافت: ۸۶/۹/۲۰، پذیرش: ۸۷/۳/۱۱

### چکیده:

مقدمه و هدف: شواهد تجربی و اپیدمیولوژیک در کشورهای غربی از نقش اتیولوژی (Human Papilloma Virus) HPV در اسکواموسل کارسینوما (S.C.C) سر و گردن حمایت می کند. ولی نقش HPV در اتیولوژی اسکواموسل کارسینوما سر و گردن در کشورهای در حال توسعه مانند ایران هنوز مورد بحث و بررسی است. هدف از این مطالعه تعیین وجود و نوع ویروس HPV در بیماران مبتلا به سرطانهای نواحی مختلف سر و گردن بستری در بیمارستان امام خمینی اهواز می باشد.

روش کار: در این بررسی مورد شاهدهی که بصورت آینده نگر مقطعی انجام شده است ۱۷۶ نفر از مبتلایان به سرطانهای سر و گردن از نوع اسکواموس سل و ۱۷۶ نفر هم به عنوان گروه کنترل که نمونه پاتولوژی آنها خوش خیم گزارش شده بود انتخاب شدند. جهت تعیین وجود و نوع HPV در نمونه های بافتی افراد مبتلا از روش PCR استفاده گردید.

نتایج: در هفت نمونه از نمونه های SCC سر و گردن که از بیماران اهوازی گرفته شده و با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفت از نظر HPV DNA مثبت شدند (۳/۹۷٪). در مورد گونه ویروس ۳ مورد گونه ۱۶ و ۲ مورد گونه ۱۸ و ۱ مورد گونه ۵۷ و ۱ مورد گونه ۳۳ بوده است. تنها ۱ مورد از نمونه های گروه کنترل مثبت شد (۰/۵۷٪). گونه ویروسی آن ۶ بوده است. آزمون مقایسه نسبت بین دو گروه تفاوت آماری معناداری را بین دو گروه مورد نظر نشان داد (P. value < 0.001).

نتیجه نهایی: این مطالعه نشان دهنده حضور ویروس در نمونه های بافتی مبتلایان به سرطان می باشد. مطالعات جامع تر و در حجم جمعیتی بیشتری در این مورد ضرورت دارد.

کلید واژه ها: پاپیلوما ویروس انسانی / سرطان سلول سنگفرشی / واکنش زنجیره ای پلیمرز

### مقدمه:

مزمن مخاطی، تابش دوز پائین اشعه، فاکتورهای شغلی و فاکتورهای ویروسی بالاخص ویروس ابشتین بار (EBV) و ویروس پاپیلوما ی انسانی (HPV) را می توان نام برد (۱،۲) رابطه اتیولوژیک بعضی از این فاکتورها مانند سیگار در سرطان حنجره و یا ویروس ابشتین بار در رابطه با سرطان

سرطان اسکواموس سل در مخاط دستگاه تنفسی فوقانی شایعترین نوع سرطان در ناحیه سر و گردن بوده و در ایجاد آن فاکتورهای متعدد ژنتیکی و محیطی دخیل می باشند (۱). از مهمترین آنها سیگار، الکل، تحریک

\* استادیار گروه گوش و حلق و بینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (nsaki\_ir@yahoo.com)

\*\* دانشیار گروه گوش و حلق و بینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

\*\*\* استاد گروه ویروس شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

\*\*\*\* دستیار گروه گوش و حلق و بینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

\*\*\*\*\* استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

میزان کافی از DNA خالص را فراهم می نمود. انتظار می رفت که در HPV غیرسرطانی، باند 450bp و در HPV اونکوژن، باند 250bp و 450bp مثبت شود (تصویر ۱).



تصویر ۱: شرح آنالیز و تایپینگ نمونه مثبت از نظر HPV  
 ۱- ladder (DNA molecular weight) ۲- کنترل منفی  
 ۳- کنترل مثبت (hela cell) ۴- کنترل مثبت (کیت)  
 ۵ تا ۸- نمونه شماره ۲۹ ۹- تایپینگ نمونه شماره ۲۹

### نتایج:

از میان ۳۵۲ نفر، ۷۲/۲٪ موارد مرد و ۲۷/۸٪ زن بودند. میانگین سنی کل افراد مورد مطالعه ۵۳/۷ سال بود و کمترین آنها ۴ ساله و بیشترین آنها ۸۵ ساله بودند. در میان موارد مبتلا به SCC، ۱۵۱ نفر (۸۵/۸٪) مرد و ۲۵ نفر (۱۴/۲٪) زن بودند، میانگین سنی این افراد ۶۷/۲ سال بود که کمترین آنها ۳۳ ساله و بیشترین آنها ۸۵ ساله بودند. در میان گروه کنترل، ۱۰۲ نفر (۵۷/۹٪) مرد و ۷۴ نفر (۴۲/۱٪) زن بودند. میانگین سنی این افراد ۴۰/۲ سال بود (کوچکترین ۴ ساله و بزرگترین ۷۵ ساله بود).

براساس بررسی های انجام شده در میان مواردی که SCC مناطق مختلف سر و گردن داشتند. سرطان حنجره بالاترین میزان شیوع ۸۲ بیمار (۴۶/۶٪) را داشت. سرطان بعدی از نظر شیوع کانسر لب ۲۴ بیمار (۱۳/۶۴٪) و سپس نازوفارنکس (۱۵ بیمار)، و زبان (۱۴ بیمار) و هیپوفارنکس (۱۳ بیمار) و لاله گوش (۱۰ بیمار). بقیه موارد شامل حفره دهان (۷ بیمار)، فارنکس (۶ بیمار)، بینی و سینوسها (۶ بیمار) می باشد.

موارد مثبت از نظر ویروس شامل سرطانهای حنجره و حفره دهان هر کدام ۲ مورد، سرطانهای لب، نازوفارنکس و اروفارنکس هر کدام ۱ مورد می باشد. در مطالعه ما هفت

ناحیه نازو فارنکس شناخته شده و رابطه بعضی همچنان مورد تحقیق و بررسی می باشد (۴-۲). از جمله این فاکتورها ویروس پاپیلوما می انسانی است.

پاپیلوما می انسانی یک ویروس کوچک دو رشته ای DNA است که حاوی ژنوم حلقوی بوده که توسط یک پوشش پروتئینی احاطه شده است (۵، ۳). این ویروس اپیتلیالوتروپیک است و به درجات متفاوتی در نمونه های سرطان حفره دهان یافت می شود (۴). این ویروس شامل بیش از صدگونه ویروسی بوده که هر کدام باعث تحریک رشد اپیتلیالی در قسمتی از بدن می شوند (۶، ۱). پاپیلوما ویروس از نظر سرطانزائی به سه گروه تقسیم می شوند: گروه باریسک بالا شامل انواع ۱۶ و ۱۸، باریسک متوسط شامل انواع ۳۰ و ۳۳ و باریسک پایین شامل انواع ۶ و ۱۱ می باشند. معتقدند این نوع ویروس با پاپیلوما می مخاطی خوش خیم دستگاه تنفسی و ناحیه زینتال همراه می باشند (۴).

هدف این مطالعه شناسایی DNA پاپیلوما ویروس انسانی به روش PCR در بافت بیماران مبتلا به سرطان SCC در دستگاه تنفسی فوقانی در بیماران بخش گوش و حلق و بینی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز می باشد.

### روش کار:

در این مطالعه مورد - شاهدهی که بصورت آینده نگر و مقطعی انجام شده است. ۱۷۶ مورد از مبتلایان به سرطانهای سروگردن (شامل حفره دهان، اوروفارنکس، نازوفارنکس، هیپوفارنکس، حنجره و بینی و سینوسها) که در سالهای ۸۱ تا ۸۵ به مدت ۵ سال به بخش گوش و حلق و بینی بیمارستان امام خمینی (ره) اهواز مراجعه داشته اند و تحت بیوپسی برای اثبات وجود SCC قرار گرفته بودند انتخاب شدند. ۱۷۶ نفر هم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند که نمونه پاتولوژی آنها خوش خیم گزارش شده بود.

نمونه ها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - و داخل سرم نگهداری شدند و سپس توسط کیت Biotypap که از شرکت اسپانیایی BioTools تهیه شده بود آنالیز گردیدند. کیتها در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - سانتی گراد نگهداری شده و صحت عملکرد آنها با انجام تستهای کنترل مثبت و منفی تأیید شد. تمام نمونه های سرطانی و گروه کنترل تحت آزمایش PCR جهت تشخیص وجود HPV-DNA قرار گرفتند. متد خالص سازی DNA برپایه استفاده از فنل یا رزین بود که

تامسون و همکارانش در مطالعه‌ای که روی بیماران چینی مبتلا به سرطان SCC لوزه انجام دادند، در هیچیک از ۱۶ بیمار چینی، نمونه‌ها از نظر پاپیلوما ویروس مثبت نبوده است، در حالیکه در بیماران استرالیایی که در مورد آنها از همان مدت استفاده شده بود (روش PCR)، نمونه‌ها به میزان ۴۶٪ مثبت بودند (۶). در مطالعه‌ای که توسط کورنتی و همکارانش در ونزویلا انجام شد و هدف آن تعیین انواع پاپیلوما ویروس در اسکوماسلهای حفره دهان بود ۵۰٪ موارد از نظر پاپیلوما ویروس مثبت بودند (۷).

همچنین در یک مطالعه گذشته نگر که در ترکیه انجام شد گونه‌های مختلف پاپیلوما ویروس از جمله ۱۱۰۶، ۱۸ و ۱۶، ۳۱ و ۳۳، به ترتیب در ۸۰٪، ۴۰٪ و ۳۰٪ موارد سرطانه‌های حنجره مشاهده گردید (۸). در مطالعه‌ای که توسط تاکاسو و همکارانش در مورد وجود پاپیلوما ویروس تیپهای ۱۶ و ۱۸ در کارسینوم بینی و سینوسهای پارانازال با روش PCR انجام شد، در ۱۴٪ موارد SCC، پاپیلوما ویروس تیپهای ۱۶ و ۱۸ مثبت گزارش گردید (۹). مکانیسم اونکوژنی پاپیلوما ویروس بخوبی شناخته نشده است ولی به نظر می‌رسد که پروتئینهای E<sub>6</sub> و E<sub>7</sub> با مهار کردن پروتئین مهار کننده تومور P<sub>53</sub> در اونکوژنی آن دخیل باشند (۱۰، ۱۱).

در مطالعه حاضر که بر روی ۳۵۲ نفر انجام شده، تمام نمونه‌ها به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند و در هر نوبت آزمایش یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی جهت اطمینان از کارایی کیت بکار گرفته شد که در تمام موارد عملکرد کیت تأیید گردید. در آنالیز انجام شده هفت مورد از موارد SCC از نظر HPV DNA، مثبت بودند. حفره دهان و حنجره هر کدام دو مورد و لب و نازوفارنکس و اروفارنکس هر کدام یک مورد پاسخ مثبت را نشان دادند. بیشترین گونه ویروس یافت شده در نمونه‌های مورد آزمایش گونه ۱۶ و ۱۸ بوده است. فقط یک مورد از نمونه‌های گروه کنترل (با تشخیص پاتولوژیک پاپیلوماتوز تنفسی راجعه از نظر پاپیلوما ویروس مثبت گزارش گردید که خود می‌تواند مطرح کننده این نکته باشد که مدت PCR انجام شده و کیت‌های آنالیز بکار برده شده جهت انجام این مطالعه کاملاً صحیح بوده و از دقت کافی برخوردار می‌باشد.

### نتیجه نهایی:

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه که در

نمونه SCC از گروه مورد از نظر پاپیلوما ویروس مثبت گزارش شد. در مورد گونه ویروس سه مورد گونه ۱۶ و دو مورد گونه ۱۸ و یک مورد گونه ۵۷ و یک مورد گونه ۳۳ بوده است (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی SCC نواحی مختلف سر و گردن در گروه مورد مطالعه و موارد مثبت از نظر وجود ویروس HPV

تعداد بیماران	درصد	موارد مثبت ویروس HPV
حنجره	۴۶/۶۰	۲
لب	۱۳/۶۴	۱
نازوفارنکس	۸/۵۲	۱
زبان	۷/۹۵	-
هیپوفارنکس	۷/۳۸	-
لاله گوش	۵/۶۸	-
حفره دهان	۳/۹۷	۲
اروفارنکس	۳/۴۱	۱
بینی و سینوس	۲/۸۵	-

در آنالیز انجام شده بر روی نمونه‌های گروه کنترل با روش PCR، ۹۹/۴۳٪ موارد از نظر پاپیلوما ویروس منفی و ۱ نفر (۰/۵۷٪) مثبت بود که این یک نفر مبتلا به پاپیلوماتوز تنفسی راجعه بوده است. ضایعات خوش خیم که مورد بررسی قرار گرفتند مجموعه‌ای شامل: پولیپ حنجره و بینی و گوش، ندول حنجره، پاپیلومای معکوس بینی، فیبروم گوش و زبان، پیوژنیک گرانولومای زبان و تیغه بینی، بافت گرانولاسیون کام سخت و مخاط دهان و گوش، پاپیلومای کام نرم، استئومای سینوس، شوانومای بینی، تومور میکس کام نرم و سخت بوده است. آزمون مقایسه نسبت بین دو گروه تفاوت آماری معناداری را بین دو گروه مورد نظر نشان داد (P. value < 0.001).

### بحث:

امروزه گزارشات زیادی از وجود پاپیلوما ویروس انسانی در ایجاد سرطانه‌های سرو گردن حمایت می‌کند. HPV DNA در سرطانه‌های حفره دهان، لوزه و حنجره در افراد با نقص ایمنی و کسانیکه تحت پیوند ارگان قرار گرفته‌اند، دیده شده است (۲). پاپیلوما ویروسها در کشت بافتی و حیوانات آزمایشگاهی معمولی تکثیر نمی‌یابند. حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیص ویروسی استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز است که برای شناسایی HPV DNA و تعیین گونه‌های اختصاصی ویروس بکار می‌رود (۵).

3. Richard C, Reichman H. Human papilloma virus infections: Harrison's principles of internal medicine. 16<sup>th</sup> ed. New York: Mc Grow-Hill, 2005: 102-106.
4. Patrick R, Murray Y. Human papilloma virus infections. In: Medical Virology 2004: 51-63.
5. Batsakis JG. Pathology of tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses 1998; 522-6.
6. Carol H, Thompson AB. Absence of HPV in Tonsillar SCC from Chinese patients. Am J Pathol 2003: 2185-2186.
7. Correnti M. Detection of human papilloma viruses of high oncogenic potential in oral SCC in a Venezuelan population. Oral Dis 2004: 163-166.
8. Kaya H, Kotiloglu E. Prevalence of human papilloma virus DNA in larynx and lung carcinoma. Pathologica 2001: 531-534.
9. Ta Kasu T. Detection of HPV DNA in carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses by PCR cancer 1997;62: 353-357.
10. Kashima HK, Bonnez W, Leventhal P, Rose RC. polymerase Chain reaction identification of human papilloma virus DNA from recurrent respiratory papillomatosis. Otolaryngol Head and Neck Surg 1991; 104: 191-196.
11. Kijima A, Kurahashi N, Sakagami G. Prevalence of human papillomaviruses infection in oral squamous cell carcinoma. J Jpn Soc Oral Tumor 2000;12:307-320.

صد تاثیر عوامل ویروسی را ناچیز نشان می دهد بنظر می رسد که در اهواز، عوامل مستعدکننده و ایجاد کننده بغیر از پاپیلوما ویروس (مثل فاکتورهای اجتماعی - اقتصادی، مصرف سیگار) نیز در ایجاد SCC در سرو گردن دخیل باشد و پاپیلوما ویروس احتمالاً نقش کمکی دارد. به هر صورت به نظر می رسد که باید مطالعات بیشتر و با جزئیات دقیق تری جهت فهم علل ایجاد SCC در سرو گردن در این استان انجام شود.

#### سپاسگزاری:

هزینه انجام این طرح از طریق حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز پرداخت شده و پرسنل گروه ویروس شناسی همکاری در خور تقدیر با ما داشته اند، از همه متشکریم.

#### منابع:

1. Burch JD, Howe GR, Miller AB. Tobacco, alcohol, asbestos and nickel in the etiology of cancer of the larynx, Nald Cancer Inst 1981; 67:1219-1221.
2. Andrew K, Lee AK, Alexander K. Role of alcohol and tobacco in the etiology of head and neck cancer: A case - control study in the Doubs region of France. Eur J Cancer 1995; 31:301-302.