

فراوانی تعدادی از انواع پرخطر ویروس پاپیلوم انسانی در نمونه‌های با درجات مختلف نئوپلازی سرویکس*

دکتر میترا حیدرپور^۱، دکتر رسول صالحی^۲،
دکتر زهرا کمالی^۳، دکتر حوری یراقی^۳

خلاصه

مقدمه: سرطان سرویکس دومین سرطان شایع زنان و از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در آنان است. نقش ویروس پاپیلوم انسانی (HPV) در سرطان‌زایی سرویکس تأیید شده است ولی انواع پرخطر آن در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است. هدف از این مطالعه تعیین انواع پرخطر این ویروس در کشور اصفهان بود.

روش‌ها: این مطالعه به روش تحلیلی گذشته نگر از نوع مورد - شاهدهی انجام شد. نمونه‌های شاهد از ۱۲ بلوک پارافینی بافت نرمال سرویکس و نمونه‌های بیمار شامل ۳۶ بلوک پارافینی از بافت سرویکس زنان مبتلا به ضایعات پیش بدخیم و بدخیم (SCC) سرویکس از سال ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۹ بود. پس از استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی وجود HPV DNA تحت Polymerase Chain Reaction (PCR) با پرایمر HPV General قرار گرفت. موارد مثبت از نظر حضور HPV با Real-Time PCR جهت تعیین نوع ویروس بررسی شدند.

یافته‌ها: فراوانی HPV در نمونه‌های بیمار بیشتر از موارد شاهد بود. در ۵۰ درصد بیماران HPV نوع ۱۶ وجود داشت. فراوانی HPV نوع ۵۹ نیز در موارد SCC نسبت به مبتلایان به سایر ضایعات به طور معنی‌داری بیشتر بود. سایر نوع‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری با ضایعات داخلی اپی‌تلیالی پیش بدخیم و بدخیم سرویکس نداشتند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که در کلیه نمونه‌های مبتلا به ضایعات سرویکس HPV حضور داشته است. اگرچه فراوانی HPV نوع ۱۶ در نمونه‌هایی که ضایعه سرویکس داشتند بیشتر بود، اما با توجه به حجم نمونه‌ی پایین این مطالعه نیاز به انجام مطالعاتی با حجم نمونه‌ی بالاتر است.

واژگان کلیدی: ویروس پاپیلوم انسانی، ویروس پرخطر پاپیلوم انسانی، واکنش زنجیره‌ی پلیمرز، ضایعات درون اپی‌تلیالی پیش بدخیم، کارسینوم مهاجم سلول سنگفرشی.

مقدمه

اصلی در پیشرفت ضایعات داخل اپی‌تلیالی به سمت کانسر سرویکس شناخته شده است (۲). در مطالعه‌ای در موزامبیک ۹/۷۵ درصد از زنان بدون ضایعه‌ی سرویکال و ۱۰۰ درصد زنان مبتلا به کانسر سرویکس حامل این ویروس در گردن رحم بودند (۳). در بین بیش از ۸۰ نوع HPV شناسایی شده حدود ۴۰ نوع می‌توانند مخاط دستگاه تناسلی را

کانسر سرویکس پنجمین سرطان توپیر و دومین سرطان شایع زنان در جهان و یکی از علل عمده‌ی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان است (۱). ارتباط ویروس پاپیلوم‌های انسانی (Human Papillomavirus (HPV) با سرطان سرویکس ثابت شده است و در مطالعات متعدد به عنوان عامل خطر

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای تخصصی پاتولوژی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

^۱ استادیار دانشکده پزشکی، متخصص پاتولوژی، بیمارستان الزهراء، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ دانشیار گروه ژنتیک دانشکده پزشکی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دستیار پاتولوژی بیمارستان الزهراء، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

شده است (۱۱) که هیچیک از آنها تفاوت معنی‌داری را بین فراوانی آنها در افراد سالم و دارای ضایعات سرویکس نشان ندادند (۴).

با توجه به متفاوت بودن انواع پرخطر این ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف و نقش پیشگویی کننده‌ی این انواع در پیشرفت به سمت کانسر سرویکس لازم است تا در صورت یافتن ارتباط معنی‌داری بین این ویروس و بروز ضایعات سرویکس، با انجام تست پاپ اسمیر به صورت منظم و دوره‌ای و در کنار آن **High Risk HPV Test** در زنان، بیماران مبتلا را شناسایی کرده و با درمان به موقع ضایعات پیش ساز کانسر مورتالیتی این بیماری را کاهش دهیم.

روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه‌ی تحلیلی بود که به صورت مورد-شاهدی و گذشته نگر انجام شد. در این مطالعه بلوک‌های پارافینی مربوط به بافت سرویکس زنانی که با درجات متفاوتی از نئوپلازی سرویکس در سال‌های ۸۵-۸۹، به دو بیمارستان دولتی در شهر اصفهان مراجعه کرده بودند، بررسی شد. نمونه‌های شاهد از بلوک‌های پارافینی ژنانی انتخاب شد که هیچ‌گونه ناهنجاری سیتولوژیکی نداشتند. در مجموع ۴۸ بلوک پارافینی سرویکس جمع‌آوری گردید (گروه بیماران ۳۶ عدد و گروه شاهد ۱۲ عدد). بلوک‌های گروه مورد خود در سه دسته‌ی **low-grade Squamous High-grade Intraepithelial Lesions (LSIL), Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL), Squamous Cell Carcinoma (SCC)** قرار گرفتند.

برای انجام بررسی در مورد وجود HPV در نمونه‌ها ابتدا DNA از بلوک‌های پارافینی استخراج و

آلوده کنند (۴). ۱۵ نوع از انواع مختلف این ویروس در ۹۹ درصد کانسره‌های سرویکس یافت شده‌اند که HPV پرخطر و با خطر متوسط نام گرفته‌اند. این انواع شامل ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸ هستند (۵).

احتمال پیشرفت ضایعات درون اپی‌تلیالی به مقدار زیاد به نوع HPV وابسته است (۶؛۷) و حضور ژنوتیپ ویروس‌های پرخطر در نمونه‌ی سرویکس موید پیشرفت به سمت مرحله‌ی کانسر است (۷).

طبق مطالعه‌ای که **Rappold** و همکارانش انجام دادند انواع کم‌خطر به طور معمول سبب پیشرفت ضایعات داخل اپی‌تلیالی نمی‌شوند و در حضور آنها احتمال کمی برای پیشرفت به سمت ضایعات داخل اپی‌تلیالی وجود دارد (۶).

براساس مطالعه‌ی **Jenkins** و همکارانش شایع‌ترین HPV‌های پرخطر در سراسر دنیا انواع ۱۶ و ۱۸ هستند که بروز حدود ۷۰ درصد کانسره‌های سرویکال به علت آلودگی با آنها است (۷).

در مطالعه‌ی انیستوی بین‌المللی کانسر، آلودگی با انواع ۱۶ و ۱۸ در ۱۰ درصد زنان طی ۳ سال و در ۲۰ درصد آنها طی ۱۰ سال به سمت ضایعات پیش سرطانی (CIN3) پیشرفت می‌کنند و در مقابل آلودگی با سایر انواع تنها در ۴ درصد افراد طی ۳ سال و ۷ درصد آنها طی ۱۰ سال منجر به ضایعات پیش سرطانی می‌شوند (۷).

طبق مطالعات زیادی که انجام شده است در مناطق جغرافیایی مختلف انواع شایع عامل ضایعات داخل اپی‌تلیالی سرویکس متفاوت هستند (۸-۱۲).

تاکنون دو مطالعه بر روی فراوانی HPV‌های پرخطر در ضایعات سرویکس نمونه‌های ایرانی انجام

و استخراج DNA قرار گرفت. در همه‌ی نمونه‌ها DNA استخراج شده کافی بود. در بررسی با پرایمر General HPV تمامی نمونه‌ها از نظر حضور ویروس HPV مورد ارزیابی قرار گرفتند. HPV کلیه‌ی نمونه‌های بیماران و ۲ نمونه از نمونه‌های نرمال دیده شد.

همانگونه که گفته شد برای تعیین نوع ویروس در نمونه‌هایی که از نظر ویروس HPV مثبت بودند از Real - Time PCR استفاده شد. در این مطالعه ۱۸ نوع ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۵۹، ۶۸، ۵۱، ۳۹، ۳۵، ۶۶، ۵۸، ۵۶ و ۵۲ بررسی شدند. نمونه‌های HPV مثبت که هیچ‌یک از این موارد را بروز ندادند HPV NA نامیده شد.

نوع ۱۶ این ویروس در ۴ نمونه از موارد با LSIL و ۸ نمونه از موارد HSIL و ۶ نمونه از موارد SCC مثبت شد که در مجموع ۳۷/۵ درصد از نمونه‌ها را شامل می‌شد. با توجه به $P=0/004$ بین این نوع ویروس و ضایعات سرطانی و پیش‌سرطانی سرویکس رابطه وجود داشت (شکل ۱).

نوع ۵۹ این ویروس در ۴ مورد از موارد SCC سرویکس مثبت بود و با توجه به $P=0/006$ بین ابتلا به این ویروس و ایجاد ضایعات SCC سرویکس رابطه وجود داشت.

قابلیت تکثیر آنها با استفاده از پرایمر SMA بررسی شد. نمونه‌های مثبت با پرایمر SMA انتخاب شدند و برای تعیین وجود DNA ویروس پاپیلوم‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور از تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای HPV General استفاده شد و در نهایت بررسی محصولات PCR توسط ژل الکتروفوروز انجام شد.

در مجموع ۴۸ بلوک پارافینی سرویکس جمع آوری گردید که تمامی آنها قابلیت تکثیر با پرایمر SMA را داشتند. نمونه‌های جمع آوری شده در مرحله‌ی بعدی از نظر وجود HPV بررسی شدند و مواردی که ژنوم HPV را داشتند برای تعیین نوع ویروس مورد بررسی **Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real - Time PCR)** قرار گرفتند (۱۳).

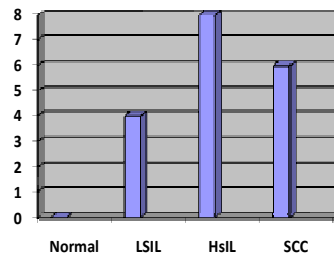
نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ و به کارگیری آزمون χ^2 آنالیز شدند. در این آزمون ها $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۴۸ نمونه‌ی بلوک پارافینی (۳۶ بلوک در گروه بیماران و ۱۲ بلوک در گروه شاهد) مورد مطالعه

جدول ۱. توزیع فراوانی نمونه‌ها از نظر وجود ویروس HPV

HPV- تعداد	HPV+ (درصد)تعداد	
۱۰	۲(۱۶/۶)	نمونه‌های شاهد
۰	۱۲(۱۰۰)	LSIL
۰	۱۲(۱۰۰)	HSIL
۰	۱۲(۱۰۰)	SCC
۱۰	۱۲(۷۹/۱۶)	همه‌ی نمونه‌ها



نمودار ۱. فراوانی نسبی HPV₁₆ در نمونه‌های نرمال و ضایعات سرویکس

بحث

بوده‌اند (۱۰). در تحقیقی در ژاپن انواع ۱۶، ۵۱، ۵۲ و ۵۸ در ضایعات شدید سرویکس دیده شدند (۱۲). در ایران نیز مطالعات متعددی بر روی فراوانی HPV در زنان انجام شده است. در تحقیقی که Farjadian و همکارانش انجام دادند شیوع HPV نوع ۱۶ پایین بوده و نوع ۱۸ نیز در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد (۱۱).

نتایج مطالعه‌ی دیگری که توسط Salehi و همکارانش در ایران انجام شد نیز نشان داد که فراوانی انواع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۳ و ۴۵ در نمونه‌های SIL و کانسر سرویکس تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های نرمال نداشت (۴).

در این مطالعه به بررسی حضور انواع متعددی (۳۵، ۳۹، ۵۱، ۶۸، ۵۹، ۳۳، ۳۱، ۱۶، ۱۸، ۴۵، ۴۴، ۴۳، ۴۲، ۱۱ و ۶) از HPV در ضایعات پیش بدخیم و بدخیم سرویکس و مقایسه‌ی آنها با نمونه‌های نرمال پرداخته شد. HPV Genotyping در این پژوهش به روش Real Time PCR - انجام شد که روشی کمی و بسیار دقیق است و نتایج حاصل از آن بسیار قابل اعتماد هستند. نتایج مطالعه‌ی ما با نتایج مطالعات قبلی در ایران متفاوت است و به مطالعات سایر نقاط جهان نزدیک‌تر است. در مطالعه‌ی ما ارتباط واضحی بین ایجاد ضایعات بدخیم (SCC) سرویکس با ابتلا به

با توجه به شیوع بالای سرطان سرویکس در زنان اکثر مناطق دنیا و ارتباط این سرطان با عوامل خطر متعدد از جمله ابتلا به ویروس پاپیلوم انسانی (۱)، تحقیق و مطالعه در این زمینه منطقی به نظر می‌رسد.

همانگونه که در نتایج این مطالعه دیده شد فراوانی HPV در مبتلایان به سرطان سرویکس شایع‌تر از افراد سالم است به طوری که تنها در نمونه‌ی دو فرد سالم (۱۶/۶ درصد) آلودگی به این ویروس دیده شد. به علاوه فراوانی HPV₁₆ در نمونه‌های با ضایعات شدیدتر (SCC و HSIL) به طور معنی‌داری بیشتر از ضایعات خفیف (LSIL) است.

ویروس پاپیلوم انسانی نوع‌های متعددی دارد و به انواع پرخطر و کم خطر تقسیم می‌شود. در بسیاری از مطالعات انواع پرخطر ارتباط اجتناب ناپذیری با ایجاد ضایعات پیش بدخیم و بدخیم سرویکس داشته‌اند. بر اساس مطالعه Jenkins و همکارانش شایعترین HPV های پرخطر در سراسر دنیا انواع ۱۶ و ۱۸ هستند (۷).

انواع پرخطر HPV گستره‌ی جغرافیایی متفاوتی دارند (۸-۱۲). در مطالعه‌ای که در سنگال انجام شد انواع ۱۶ و ۵۸ بیشترین ارتباط را با کانسر سرویکس نشان دادند (۹). در موزامبیک انواع ۳۵ و ۵۸ غالب

نیست و عوامل مستعد کننده‌ی مختلف اثرات متقابل دارند و به طور قطع مسایل دیگری مانند سن ازدواج، مصرف دخانیات، هورمون‌ها، ابتلای هم‌زمان به سایر میکروارگانسیم‌ها از جمله کلامیدیا و یا هرپس نیز بر این روند تأثیر می‌گذارند و نیاز است در مطالعه‌ای این عوامل به طور هم‌زمان بررسی شوند.

به هر طریق از آنجایی که سرویکس یک عضو قابل دسترس است و با آزمایشات ساده‌ای مانند پاپ اسمیر که انجام آنها آسان و کم هزینه است می‌توان به راحتی ابتلا به این ویروس را در مراحل اولیه تشخیص داد و قبل از پیشرفت به سمت ضایعات بدخیم آن را در مان نمود، توصیه می‌شود که آموزش‌های لازم به زنان جامعه در خصوص انجام مرتب پاپ اسمیر صورت گیرد.

ویروس HPV نوع ۵۹ و نیز ضایعات LSIL و SCC با ابتلا به نوع ۱۶ دیده شد. البته با توجه به کم بودن تعداد نمونه‌ها نیاز به مطالعات گسترده‌تری در مورد فراوانی HPV در ایران است.

با وجود پرخطر بودن نوع ۱۸ در اکثر مناطق دنیا طی چند مطالعه‌ی اخیر انجام شده در ایران رابطه‌ای بین حضور این ویروس و ایجاد ضایعات پیش بدخیم و بدخیم سرویکس مشاهده نشد، گرچه واضح است که همچنان تحقیق و بررسی در این زمینه نیازمند تلاش بیشتری است. از طرف دیگر نمونه‌های HPV مثبت که نوع آنها توسط پرایمرهای موجود مشخص نشدنیاز به بررسی بیشتری دارند.

توجه به این مسئله حائز اهمیت است که ایجاد ضایعات بدخیم سرویکس متأثر از یک فاکتور منفرد

References

1. Scott JR, Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF. Danforth's Obstetrics and Gynecology. 10 ed. L W W; 2008.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189(1):12-9.
3. Castellsague X, Klaustermeier J, Carrilho C, Albero G, Sacarlal J, Quint W, et al. Vaccine-related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention. *Int J Cancer* 2008 Apr 15;122(8):1901-4.
4. Salehi H, Tamizi F. Combined infection with herpes simplex virus and human Papilloma in subjects with various degrees of cervical neoplasia. *Journal of Isfahan Medical School* 22, 24-32. 2004.
5. Takacs T, Jeney C, Kovacs L, Mozes J, Benczik M, Sebe A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods* 2008 Apr;149(1):153-62.
6. Rappold G, Rosenmayr E. [High-pressure injection injuries of the hand. Pathogenesis, problems and therapy]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2001 Sep;33(5):332-41.
7. Jenkins D, Sherlaw-Johnson C, Gallivan S. Can papilloma virus testing be used to improve cervical cancer screening? *Int J Cancer* 1996 Mar 15;65(6):768-73.
8. Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, Kornegay JR, dos SF, Gomez-Olive FX, et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. *Lancet* 2001 Oct 27;358(9291):1429-30.
9. Marais DJ, Constant D, Allan B, Carrara H, Hoffman M, Shapiro S, et al. Cervical human papillomavirus (HPV) infection and HPV type 16 antibodies in South African women. *J Clin Microbiol* 2008 Feb;46(2):732-9.
10. Naucler P, Da Costa FM, Ljungberg O, Bugalho A, Dillner J. Human papillomavirus genotypes in cervical cancers in Mozambique. *J Gen Virol* 2004 Aug;85(Pt 8):2189-90.
11. Farjadian S, Asadi E, Doroudchi M, Dehaghani AS, Tabei SZ, Kumar VP, et al. High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer. *Pathol Oncol Res* 2003;9(2):121-5.
12. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in

Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 Jan;10(1):45-52.
13. Scheurer ME, Dillon LM, Chen Z, Follen M, Adler-Storthz K. Absolute quantitative real-time

polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infect Agent Cancer* 2007;2:8.

Archive of SID

The Frequency of High Risk Sub-Types of Human Papillomavirus in the Samples with Varying Degrees of Cervical Neoplasia*

Mitra Heydarpour PhD¹, Rasool Salehi PhD²,
Zahra Kamali PhD³, Houriyaraghi PhD³

Abstract

Background: cervical cancer is the second most common cancer of women and one of the most important factors in their mortality. The role of human Papillomavirus (Hpv) in cervical carcinogenesis has been confirmed, but the high risk subtypes are different in different areas. The purpose of this study was to determine high-risk sub-types of HPV in Isfahan.

Methods: This study was a case-control, retrospective and analytical study. We collected the data from 12 paraffin blocks of normal cervical tissue and 36 paraffin blocks of cervical tissue of women with pre-malignant and malignant lesions (scc). After DNA extraction from paraffin blocks existence of HPV DNA was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) with the primer HPV General. HPV positive cases were tested with Real - Time PCR to determine the virus subtype.

Finding: The prevalence of HPV in patient samples was higher than control cases. 50 percent of patients had HPV type 16. The frequency of HPV type 59 HPV types in SCC cases was significantly greater than others. There was not a significant correlation between other sub-types and cervical tissue lesion.

Conclusion: This study showed that HPV was present in all samples with cervical lesions. Although the high frequency of HPV type 16 in cervical samples, due to low sample size of this study further studies with larger sample size is needed.

Keywords: Papillomavirus, High risk Papillomavirus, Polymerase Chain Reaction, Squamous Intra-epithelial Lesions, Squamous Cell Carcinoma.

*This paper derived from a medical Speciality thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Assistant Professor, Department of Genetics and Moleculer Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Resident, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mitra Heidarpour MD, Email: heidarpour@med.mui.ac.ir