

بررسی توزیع فراوانی ویروس HPV18 از طریق حضور ژن انکوپروتئین E6 در نمونه بیماران مبتلا به سرطان سرویکس

سید مصطفی مصطفوی زاده^۱، محمد نیاکان^۲، علی احمدی^۳، سهراب آقابزرگی^۴، رامین لک^۵، سیده افروز عظیمی^۶، احمد پیروزمند^{۶*}
خلاصه:

سابقه و هدف: آلوده شدن با انواع پرخطر پاپیلوما ویروس فاکتور مهمی در بروز سرطان سرویکس می‌باشد. از آنجا که کشت سلولی و روش‌های سرولوژیک در شناسایی این ویروس و انواع آن فاقد ارزش هستند، اهمیت روش‌های مولکولی در تشخیص قطعی و زودرس این ویروس آشکار می‌گردد. هدف از مطالعه، بررسی فراوانی ویروس HPV18 از طریق ژن E6 از نمونه‌های بلوک پارافینی با استفاده از روش PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از بین ۱۵۰ بلوک پارافینی از ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم تهیه شده طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۰ تعداد ۶۹ نمونه انتخاب شد و چک لیستی از آنها تکمیل گردید. سپس، استخراج DNA از بلوک‌های پارافینه با روش فنل/کلروفرم انجام گرفت. جهت بررسی HPV عمومی و HPV-18 به ترتیب از پرایمرهای ژن‌های L1 و E6 استفاده گردید.

نتایج: از میان ۶۹ بیمار مبتلا به سرطان دهانه رحم، ۵۳ مورد (۷۶/۸ درصد) از نظر HPV مثبت و ۱۶ مورد (۲۳/۱۹ درصد) منفی بودند. از این تعداد مثبت ۱۲ مورد (۱۷/۳۹ درصد) HPV18 مثبت بود. ۶ بیمار دارای تشخیص Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN II, III) و ۶ بیمار دارای تشخیص Squamous Cell Carcinoma (SCC) بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از مطالعه ما نتایج مطالعات قبلی مبنی بر ارتباط میان HPV و سرطان دهانه رحم را تقویت می‌کند. با توجه به پروتکل به‌کار رفته در استخراج DNA و PCR، می‌توان به‌صورت معمول این تست را در آزمایشگاه پاتولوژی با امکانات ساده و ارزان انجام داد.

واژگان کلیدی: ژن انکوپروتئین E6، سرطان سرویکس، ویروس HPV18

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۲، صفحات ۲۹۳-۲۸۷

مقدمه

همانند اکثر سرطان‌ها، سرطان‌زایی سرویکس یک فرآیند چند مرحله‌ای است که با انتقال و ورود ویروس آغاز می‌شود [۶]. سرطان سرویکس که در اثر آلودگی به ویروس HPV ایجاد می‌شود یک بیماری منتقله از راه جنسی (STD) است [۷]. در میان افرادی که شرکای جنسی متعددی دارند، به‌خصوص در سنین پایین احتمال ایجاد عفونت پایدار بیشتر است [۹،۸]. اتیولوژی و پاتوژنز دهانه رحم شامل عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی است که منجر به ترانسفورماسیون سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود. مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین علل محیطی ایجاد این سرطان ویروس می‌باشد که در واقع ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV) عامل ضروری برای ایجاد این نوع سرطان قلمداد می‌شود [۱۱،۱۰]. در کشورهای اسلامی بنا به دلایل عرفی و مذهبی میزان بروز سرطان سرویکس کمتر و در حدود ۶/۸ در یک‌صد هزار نفر در جمعیت زنان گزارش شده است. میانگین مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و نیافته به ترتیب ۴۳ و ۴۶ درصد می‌باشد که تفاوت چشم‌گیری از این نظر بین آنها مشاهده نمی‌شود، اما نسبت مرگ و میر در اثر سرطان دهانه رحم در کشورهای اسلامی تقریباً ۵۴ درصد می‌باشد. احتمالاً این تفاوت نشان می‌دهد که در بین زنان کشورهای اسلامی بنا به دلایل خاصی مراجعه به مراکز درمانی و تشخیص

عفونت پاپیلوما ویروس یک فاکتور سرطان‌زای اصلی در ایجاد سرطان سرویکس است که بدخیمی عمومی رایج و دومین سرطان شایع در میان زنان در سراسر دنیا می‌باشد [۲،۱]. عفونت پاپیلوما ویروس شامل عفونت‌های پوستی، سرطان‌های آنال و سرویکس می‌باشد که در سرتاسر جهان به‌ویژه در ایران عمومیت دارند [۴،۳]. مطالعات زیادی نشان داده‌اند برخی از انواع پاپیلوما ویروس‌ها که تحت عنوان HR-HPV معروفند نقش مهمی را در سرطان سرویکس دارند؛ به‌طوری‌که در بیش از ۹۹ درصد سرطان‌های سرویکس در جهان شناسایی شده‌اند [۵].

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه شاهد

^۲ استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

^۳ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران

^۴ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار

^۵ کارشناسی ارشد میکروب شناسی، بیمارستان پارس، تهران

^۶ دانشیار، گروه میکروب شناسی و ویروولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب روانی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و ویروولوژی

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۷۵۰۵۷

تلفن: ۰۹۱۳ ۲۶۲۳۵۲۳

پست الکترونیک: Apiroozmand@kaums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۷

خطر HPV در نمونه‌های تازه موجود می‌باشد، ولی گزارش‌های کمی از تشخیص با استفاده از PCR در نمونه‌های پارافینی سرطانی سرویکس وجود دارد [۲۱]. در این مطالعه روش اختصاصی، حساس و ساده‌ای را به کار بردیم که می‌تواند ناحیه E6 از HPV18 را به صورت اختصاصی در بلوک‌های پارافینی تشخیص دهد.

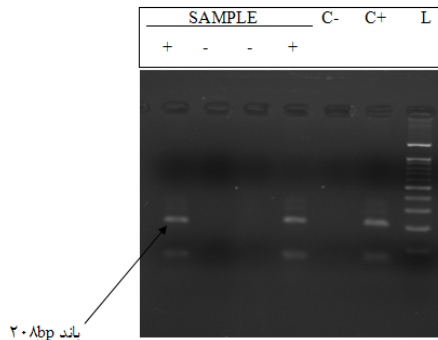
مواد و روش‌ها

۶۹ نمونه بلوک پارافینی مربوط به سرطان دهانه رحم پس از مطالعه پرونده‌های حجم نمونه بیمارستانی و پرونده‌های بخش پاتولوژی بیمارستان‌های پارس، میرزا کوچک خان و امام خمینی تهران و مرور لام‌های مربوطه انتخاب شدند. از بلوک‌های فوق یک برش ۴ میکرونی تهیه شده و روی لام فیکس شد. این برش‌ها به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ گردید تا مورد تایید پاتولوژیست قرار گیرد. بعد از تایید پاتولوژیست جهت استخراج DNA از بلوک پارافینه، ۲-۱ برش ۱۰ میکرونی تهیه شده و در تیوب اپندورف ریخته و به آن ۱ سی‌سی گزیلول ۶۰ درجه اضافه گردید. به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه در داخل دستگاه Hot block گذاشته و با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و همین کار دوباره تکرار شد. بعد از آن گزیلول رویی را خالی کرده و به آن اتانل ۹۹ درصد اضافه کرده که مشابه مرحله قبل در دمای ۶۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه گذاشته شده و دو بار تکرار گردید. سپس، سانتریفیوژ شده و ماده رویی تخلیه و تیوب‌ها در هوای آزاد قرار داده شدند تا خشک گردند. متعاقباً به آن ۳۰۰ μl از بافر هضم (50mM Tris-HCL [pH 7.5], 10mM EDTA, 0.5% Sodium dodecyl sulfate, 50 mM NaCL و 1.5 mg/ml Proteinase K) محصول شرکت Merck اضافه شده و در دمای ۵۶ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد تا پروتئین‌هایی که در موجود است، هضم شوند. بعد از سانتریفیوژ کردن، ماده رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. برای به دست آوردن اسید نوکلئیک خالص، روند استخراج DNA با استفاده از روش فنل / کلروفرم پیگیری شد. پس از استخراج DNA، با استفاده از جفت پرایمر عمومی MYO9 و MY11، حضور ویروس HPV و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی E6 نوع خطر آن، HPV-18، مشخص گردیدند. از آنجا که بیان انکوژن‌های E6 و E7 انواع ۱۶ و ۱۸ ویروس HPV ارتباط مثبت قدرتمندی با گسترش سرطان مهاجم سرویکس را نشان می‌دهد مطابق جدول شماره ۱ پرایمری انتخاب گردید که حداکثر اختصاصیت برای ناحیه تکثیر شونده E6 از HPV DNA را داشته باشد [۲۲، ۲۳].

کمتر از سایر کشورها صورت می‌پذیرد و به علت نداشتن آگاهی درباره روش جلوگیری از بیماری‌های منتقله جنسی و عدم انجام منظم تست‌های غربالگری خطر عفونت پایدار HPV به طور وسیعی افزایش یافته است [۱۲]. میزان فراوانی و گستردگی ویروس بستگی به مناطق جغرافیایی نیز دارد و حتی از افراد به ظاهر سالم نیز تیپ‌های خطر ساز ویروس شناسایی می‌شود. ممکن است در نواحی مختلف تفاوت‌هایی بین شیوع ژنوتایپ‌های مختلف ویروس پاپیلوما‌ی انسانی وجود داشته باشد و انواع پرخطر آن گسترش جغرافیایی مختلفی داشته باشند. برای مثال در موزامبیک ژنوتایپ‌های ۳۵ و ۵۸ غالب می‌باشند و HPV58 بیشتر در منطقه اقیانوس آرام شیوع دارد [۱۳، ۱۴]. تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های HPV به دلیل نبود سیستم‌های کشت سلولی مناسب جهت کشت و جداسازی ویروس و محدودیت روش‌های شناسایی آنتی‌ژن ویروسی کمی پیچیده است. برای شناسایی HPV در نمونه‌های بالینی DNA ویروس هدف جستجو قرار می‌گیرد و روش PCR کاربرد فراوانی داشته و از حساسیت و ویژگی مطلوبی برخوردار است؛ به طوری که به تشخیص قطعی بیماری کمک بسیار می‌کند. بر اساس مطالعات انجام شده به وسیله مرکز بین المللی تحقیقات سرطان در ۲۲ کشور مختلف جهان ۹۹/۷ درصد از ۱۰۰۰ نمونه گرفته شده با تاریخچه‌ی تایید شده‌ی Invasive cervical cancer (ICC) توسط پرایمر برای ویروس HPV مثبت نشان داده شدند. بیش از نیمی از سرطان‌های سرویکس دارای آلودگی به ویروس HPV16 بوده و در اولویت بعدی HPV18 قرار دارد که ۱۵ درصد از حضور این ویروس را تشکیل می‌دهد [۱۴]. دو محصول ژنی E6 و E7 در بیشتر سرطان‌ها و پیش‌سرطان‌ها بیان می‌شوند. این ژن‌ها مسئول ترانسفورماسیون سلول‌ها هستند و برای بدخیمی‌های مرتبط با HPV مورد نیازند [۱۵]. انکوپروتئین‌های E6 و E7 در عملکرد پروتئین‌های سرکوبگر تومور p53 و pRB دخالت کرده و باعث تکثیر سلولی بالا و بی‌ثباتی ژنومی می‌شوند [۱۶، ۱۷]. E6 ویروس HPV با ریسک بالا خیلی متفاوت از ویروس با ریسک پایین عمل می‌کند. بسیاری از مطالعات که این دو را باهم مقایسه کرده‌اند، نشان می‌دهند که E6 و E7 ویروس‌های با ریسک بالا می‌توانند سلول‌های کراتینوسیت را به دلیل از کار انداختن کلیدهای ممانعت تکثیر و آپوپتوز نامیرا کنند [۱۸]. در حال حاضر روش‌هایی برای تشخیص HPV از طریق PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی MYO9/MY11 و GP5+/GP6+ توصیف شده‌اند که با آنها می‌توان طیف وسیعی از HPV ها و نه انواع پرخطر را نشان داد [۱۹، ۲۰]. از طرف دیگر مطالعات زیادی در مورد بررسی انواع پر

جدول شماره ۱- پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص نمونه‌های HPV DNA در سرطان سرویکس

| منبع | اندازه محصول | توالی تکثیر شونده | ناحیه تکثیر شونده | پرایمر |
|------|--------------|---|-------------------|-------------------------------|
| [۲۲] | ۴۵۰bp | 5- CGTCC(AC)A(AG)(AG)GGA(T)ACTGATC-3 5- GC(AC)CAGGG(AT)CATAA(CT)AATGG -3 | L1 | HPV(MY09/MY1) |
| [۲۳] | ۲۰۸ bp | F:5- CAGTATACCGCATGCTGCATGCCA-3 R: 3-CAACGGTTTCTGGCACCGCAGTC-5 | E6 | HPV18 (پرایمر مختص نوع E6) |



شکل شماره ۱- باند ۲۰۸bp مربوط به ژن HPV18 E6.

L: Ladder, C+: Positive Control, C-: Negative control
راهنما، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی

مطابق پروتکل زیر تمامی نمونه‌ها به روش PCR بررسی شدند: مخلوط واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه گردید که حاوی ۰.۵μl dNTP، ۰.۲μl MgCl₂، ۰.۶μl 10 X Buffer، ۰.۳۵μl H₂O، ۰.۵μl Primer F، ۰.۵μl Primer R، ۰.۵μl Taq و ۵ μl از DNA الگو تهیه شده از شرکت سیناژن می‌باشد. پس از انجام واکنش PCR در ترموسایکلر اپندورف و طبق برنامه مندرج در جدول شماره ۲، محصول به دست آمده در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی گردید (شکل شماره ۱). در نهایت با استفاده از آزمون‌های دقیق فیشر و مجذور کای ارتباط بین آنها مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

با استفاده از پرایمرهای مخصوص عموم HPV ها، ۵۳ مورد (۷۶/۸۱ درصد) از ۶۹ نمونه مثبت شدند. از این تعداد ۱۷ مورد (۶۵/۳۹ درصد) در مراحل ۲ و ۳ نئوپلازی داخل اپی تلیال سرویکال (CIN II و CIN III) و ۳۶ مورد دارای سرطان بودند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HPV18 E6، ۱۲ مورد (۱۷/۳۹ درصد) از ۶۹ بلوک پاراتینه، مثبت (محصولات PCR با طول باند ۲۰۸bp) بودند. از این ۱۲ بیمار ۶ مورد CIN II و CIN III و ۶ مورد SCC (اسکوآموس سل کارسینوما) داشتند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲- شرایط انجام PCR

| مرحله | حرارت | زمان | تعداد چرخه |
|------------------|-------|----------|------------|
| بازشدن اولیه | ۹۵ °C | ۵ دقیقه | ۱ |
| بازشدن | ۹۵ °C | ۳۰ ثانیه | |
| اتصال پرایمر | ۵۵ °C | ۴۵ ثانیه | ۴۰ چرخه |
| طولیل سازی | ۷۲ °C | ۱ دقیقه | |
| طولیل سازی نهایی | ۷۲ °C | ۵ دقیقه | ۱ |

جدول شماره ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی موارد مورد مطالعه بر حسب آلودگی به HPV و HPV18

| تشخیص | HPV18 | | HPV | | جمع |
|----------|----------|------------|------------|------------|-----|
| | منفی | مثبت | منفی | مثبت | |
| CIN | ۲۶(٪۱۰۰) | ۲۰(٪۷۶/۹۲) | ۹(٪۳۴/۶۱) | ۱۷(٪۶۵/۳۹) | |
| پاتولوژی | ۴۳(٪۱۰۰) | ۳۷(٪۸۶/۰۵) | ۷(٪۱۶/۲۸) | ۳۶(٪۸۳/۷۲) | |
| جمع | ۶۹(٪۱۰۰) | ۵۷(٪۸۲/۶۱) | ۱۶(٪۲۳/۱۹) | ۵۳(٪۷۶/۸۱) | |

CIN و SCC در تمام بیماران به ترتیب زیر گزارش گردید: ۵۲/۲۷ درصد از بیماران از قرص استفاده می‌کردند، ۳۱/۸۱ درصد مصرف دخانیات داشتند و ۴۳/۱۸ درصد از بیماران بیش از ۴ بار زایمان داشتند.

همچنین، یافته‌های این مطالعه (جدول شماره ۴) نشان داد که بیشتر بیماران مبتلا به SCC و CIN در طیف سنی ۵۹-۴۰ قرار داشتند که معادل ۵۷/۹۷ درصد می‌باشد. سوابق OCP، مصرف دخانیات و زایمان از ۴۴ بیمار در دسترس بود که بنا بر ابتلای به

جدول شماره ۴- توزیع فراوانی HPV بر حسب عوامل خطر سرطان سرویکس HPV در افراد مورد مطالعه

| متغیر | HPV گروه‌ها | منفی | مثبت | جمع تعداد (درصد) | P |
|---------------------|-------------|-----------|-----------|------------------|-------|
| سن | ۳۹ و کمتر | (/۵۰)۷ | (/۵۰)۷ | ۱۴ | ۰/۰۱۶ |
| | ۴۰-۵۹ | (/۸۰)۳۲ | (/۲۰)۸ | ۴۰ | |
| سن ازدواج | ۱۴ و بیشتر | (/۹۳/۶)۱۴ | (/۶۷)۱۱ | ۱۵ | ۰/۴۳۴ |
| | ۱۷ و کمتر | (/۱۴/۳)۴ | (/۸۵/۷)۲۴ | ۲۸ | |
| مصرف دخانیات | دارد | (/۰)۰ | (/۱۰۰)۷ | ۷ | ۰/۵۴۵ |
| | ندارد | (/۱۳/۳)۲ | (/۸۶/۷)۱۳ | ۱۵ | |
| مصرف قرص ضد بارداری | دارد | (/۲۰/۷)۶ | (/۷۹/۳)۲۳ | ۲۹ | ۰/۶۹۵ |
| | ندارد | (/۱۳/۳)۲ | (/۸۶/۷)۱۳ | ۱۵ | |
| تعداد زایمان | ۳ و کمتر | (/۱۹)۴ | (/۸۱)۱۷ | ۲۱ | n.s |
| | بیشتر از ۴ | (/۱۷/۴)۴ | (/۸۲/۶)۱۹ | ۲۳ | |

بحث

هدف از این مطالعه سنجش فراوانی ویروس HPV18 از طریق ژن E6 در نمونه‌های بافت سرطانی دارای ویروس با استفاده از پرایمر عمومی و هم‌چنین از طریق ژن E6 می‌باشد. به دلیل اینکه غربالگری سیتولوژیک به تنهایی برای تشخیص روند سرطان‌زایی کفایت نمی‌کند و اینکه مطالعات ثابت کرده‌اند آنهایی که سرطان داشته‌اند حتماً HPV نیز در آنها وجود دارد با مشخص شدن تیپ-های پرخطر ویروس پاپیلوما ویروس انسانی که عامل اصلی سرطان سرویکس بوده و تعیین به موقع و درمان سریع این نوع عفونت‌ها، می‌تواند از پیشرفت ضایعات ایجاد شده و سرطانی شدن ممانعت نمود. هم‌چنین، می‌توان به اهمیت و ضرورت جایگاه تشخیص حضور ژنوم ویروس پاپیلوما ویروس انسانی و میزان بیان تظاهر پروتئین E6 در برنامه‌های غربالگری در جامعه و اقدامات معمول بالینی پی برد. در مطالعه حاضر از مجموع ۶۹ نمونه در ۵۳ مورد از آنها ویروس یافت شد که معادل ۷۶/۸ درصد بوده و از این تعداد ۱۲ مورد (۱۷/۳۹ درصد) DNA پاپیلوما ویروس انسانی نوع ۱۸ شناسایی شد که نزدیک به نتایج جهانی می‌باشد [۲۵، ۲۴]. البته مطالعاتی در این زمینه توسط محققین کشورمان به صورت منطقه‌ای انجام شده است. به عنوان مثال همکار و همکارانش [۲۶] در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۲ بر روی ۱۰۰ نمونه بیوپسی در منطقه مازندران نشان دادند که انواع ژنوتیپ ۱۶ و ۱۸ در ۶۰/۶ درصد موارد کارسینوم‌های سرویکس وجود دارند. فرجادیان و همکارانش نیز در مطالعه‌ای که در شیراز و طی سال ۱۳۸۳ بر روی ۱۰۱ نمونه بافت صورت گرفته نشان دادند HPV16 در ۲۶/۷ درصد و از موارد سرطان سرویکس یافت گردید و HPV18 در هیچ‌یک از نمونه‌ها یافت نگردید [۲۷]. این مطلب می‌تواند تفاوت

موقعیت جغرافیایی را نشان دهد. در مطالعه حاضر سعی بر این بود که به طور تصادفی بیماران مربوط به اقصی نقاط ایران وارد مطالعه گردند. در مطالعه‌ی غفاری که بر روی ۱۳۴ نمونه ترشحات زنان نرمال و غیر نرمال در سال بر روی ۱۳۴ نفر انجام شد، ژنوتیپ ۱۸ در ۲۸ درصد افرادی که تومور داشتند و ۸ درصد در کل نمونه-های غیر نرمال وجود داشت به نظر می‌رسد تفاوت آماری به نوع نمونه و درجه وخامت آن مربوط باشد [۲۸]. در دو مطالعه‌ای که توسط نیاکان و همکاران در سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۹ بر روی نمونه‌های بافتی سرطان سرویکس [۳۰، ۲۹] انجام شده است به ترتیب حضور پاپیلوما ویروس انکوژنیک را ۲۴/۷ درصد و ۶۵ درصد گزارش نموده‌اند که مطالعه اول شاید به دلیل پایین بودن تعداد نمونه‌ها مطابقت کمتری با مطالعه ما دارد، ولی در مطالعه دوم هم‌خوانی بیشتری وجود دارد. در مطالعه‌ای در کشور مجارستان که توسط Pávai و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۶۶ نمونه ترشحات انجام شد، ژنوتیپ ۱۸ و ۱۶ به ترتیب ۴۶-۶۳ درصد و ۱۰-۱۴ درصد گزارش گردید [۳۱]. این آمار در مطالعه‌ای که در کشور آلمان توسط Varnai و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ۵۸ نمونه بافتی انجام شده است به ترتیب ۴/۵ و ۶۶/۶۶ درصد گزارش گردید که به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به خاطر تفاوت جغرافیایی است. شاید یکی دیگر از تفاوت‌ها به دلیل استفاده از نمونه‌های بلوک پارافینه بجای نمونه‌های بافت تازه باشد که در مطالعات دیگران استفاده شده است [۳۲]. گاهی موارد نیز ممکن است عفونت HPV با DNA ویروسی غیر اینتگره صورت گرفته باشد. لازم به ذکر است که آلودگی به ویروس پاپیلوما ویروس انسانی مهم‌ترین عامل برای ایجاد سرطان سرویکس است، ولی برای ایجاد این بیماری عوامل مستعد کننده دیگری هم از جمله سن ازدواج، مصرف دخانیات، و

آمده از DNA استخراج شده از برش بلوک‌های پارافینی برای آزمایش PCR کافی می‌باشد و با توجه به کارایی این پروتکل می‌توان به صورت معمول این تست را در آزمایشگاه پاتولوژی با استفاده از امکانات ساده و ارزان انجام داد. نظر به این که در سرطان دهانه رحم به علت در دسترس بودن بافت مربوطه بیش از هر سرطان دیگری اثرات پیشگیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ و میر مشهود است [۳۷]، این آزمایش علاوه بر اینکه برای واکسیناسیون بعد از تعیین HPV استفاده می‌شود، می‌تواند به غربالگری جمعیت‌هایی که به عفونت تحت بالینی با ویروس مبتلا هستند نیز کمک نماید. نتیجه کلی اینکه استفاده از روش حساس PCR در تشخیص سرطان سرویکس و تعیین حضور ژنوم مفید بوده و به علاوه با این تکنیک می‌توان انواع مختلف ویروس HPV را در افراد بیمار و حتی به ظاهر سالم نیز شناسایی نموده و بهره گرفتن از این سیستم می‌تواند به مطالعات اپیدمیولوژی ویروس HPV در جامعه کمک بزرگی نماید.

تشکر و قدردانی

در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد به جهت همکاری در اجرای این پروژه و نیز همکاران محترم بخش مولکولی بیمارستان پارس تشکر و قدردانی می‌گردد.

مصرف قرص‌های پیشگیری از بارداری دخالت دارند. در اصل بروز سرطان بیشتر مدیون مرور زمان و جمع آمدن ریسک فاکتورهای متعدد در کنار عفونت پایدار HPV است. سن همیشه یکی از فاکتورهای اصلی عفونت HPV است؛ در بعضی از کشورها به نظر می‌رسد که عفونت با افزایش سن کاهش می‌یابد. بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که زنان جوان‌تر از ۲۵ سال بیشتر مورد تاثیر این ویروس قرار می‌گیرند [۳۳]. توزیع سنی این بیماری از یک الگوی Bimodal پیروی می‌کند که دارای دو پیک سنی ۳۹-۳۵ و ۶۰-۶۴ سال است [۳۵،۳۴]. بررسی ما نشان داد گروه سنی ۵۹-۴۰ سال بیشترین درصد بیماران آلوده به HPV و HPV18 را تشکیل می‌دادند و این مشابه نتایج به دست آمده توسط Ramdas Chatterjee و همکاران در هند است که ۴۵/۸۸ سال می‌باشد، ولی بر خلاف نتایج آنها همه بیماران منفی از نظر HPV نیز در همین گروه سنی قرار دارند [۳۶]. اگرچه افرادی که در سنین کمتر از ۱۸ سال ازدواج کرده‌اند و مصرف کنندگان قرص‌های ضد بارداری و دارای بیش از ۳ زایمان بیشترین گروه مبتلایان به سرطان سرویکس در اثر عفونت HPV18 بودند، اما در آزمون مجذور کای رابطه معناداری مابین فراوانی عفونت HPV18 و تعداد زایمان نشان داده نشد.

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج نشان دادند که کیفیت و محصول به دست

References:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- [2] Jacobs MV, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Dillner J, Forslund J, Johanson B, et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an inter method and intra method comparison. *J Clin Pathol* 1999; 52(7): 498-503.
- [3] Bolhassani A, Zahedifard F, Taghikhani M, Rafati S. Enhanced immunogenicity of HPV16E7 accompanied by Gp96 as an adjuvant in two vaccination strategies. *Vaccine* 2008; 26(26): 3362-70.
- [4] Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. *Open Virol J* 2012; 6: 241-8.
- [5] Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; 164(7): 1017-25.
- [6] Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 2010; 407(1): 137-42.
- [7] Al-Awadhi R, Chehadeh W, Al-Jassar W, Al-Harmi J, Al-Saleh E, Kapila K. Viral load of human papillomavirus in women with normal and abnormal

- cervical cytology in Kuwait. *J Infect Dev Ctries* 2013; 15: 7(2): 130-6.
- [8] Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al. editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Section 3: Cancer Etiology. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116380/>
- [9] Urrutia MT, Concha X, Riquelme G, Padilla O. Knowledge and preventive behaviors related to cervical cancer and human papilloma virus in a group of Chilean adolescents. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29(6): 600-6.
- [10] Cox JT. Human papilloma virus testing in primary cervical screening and abnormal papanicolaou management. *Obstet Gynecol Surv* 2006; (6 Suppl 1): 515-25.
- [11] Goodman MT, Shvetsov YB, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Thompson PJ, et al. Prevalence, acquisition, and clearance of cervical human papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus Cohort Study. *Cancer Res* 2008; 68(21): 8813-24.
- [12] Naucler P, Da Costa F, Ljungberg O, Bugalho A, Dillner J. Human papillomavirus genotypes in cervical cancers in Mozambique. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 8): 2189-90.

- [13] Simbar F, Tehrani R, Hashemi Z. Reproductive health knowledge, attitudes and practices of Iranian college students. *East Mediterr Health J* 2005; 11(5-6): 888-97.
- [14] Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Clin Virol* 2000; 19(1-2): 1-5.
- [15] Yan J, Reichenbach D, Corbitt N, Hokey DA, Ramanathan M, McKinney KA, et al. Induction of antitumor immunity in vivo following delivery of a novel HPV-16 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion antigen. *Vaccine* 2009; 27(3): 431-40.
- [16] Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20(54): 7874-87.
- [17] Southern SA, Herrington CS. Disruption of cell cycle control by human papillomaviruses with special reference to cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10(4): 263-74.
- [18] Muench P, Hiller T, Probst S, Florea A, Stubenrauch F, Iftner T. Binding of PDZ proteins to HPV E6 proteins does neither correlate with epidemiological risk classification nor with the immortalization of foreskin keratinocytes. *Virology* 2009; 387(2): 380-7.
- [19] Evans MF, Adamson CS, Simmons-Arnold L, Cooper K. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clin Pathol* 2005; 5: 10.
- [20] Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6):1304-10.
- [21] Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, Vogl G, Doppelmayr H, Moré E, et al. Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3758-65.
- [22] Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1304-10.
- [23] Shen M, Ding X, Li T, Chen G, Zhou X. Human papillomavirus type 18 strain 18-558 E6 protein (E6) gene, complete cds. Unpublished. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. GenBank: KC456640.1
- [24] Jeng CJ, Phdl, Ko ML, Ling QD, Shen J, Lin HW, et al. Prevalence of Cervical Human Papillomavirus in Taiwanese Women. *Clin Invest Med* 2005; 28(5): 261-6.
- [25] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Natl Cancer Inst* 1995; 87(11): 796-802.
- [26] Hamkar R, Azad TM, Mahmoodi M, Seyedirashti S, Severini A, Nategh R. Prevalence of human papillomavirus in Mazandaran Province, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2002; 8(6): 805-11.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Niakan M, Eftekhari Z, Jamali M, Golalipour F, Faghihzadeh S, Jalali M. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *Cell J (Yakhteh)* 2004; 5(20): 154-7.
- [30] Niakan M, Yarandi F, Entezar M. Human papillomavirus detection in biopsies from cervical cancer patients; a population-based study from Iran. *Iran J Clin Inf Dis* 2009; 4(1): 35-7.
- [31] Pávai Z, Füle T, Horváth E, Máthé M, Pap Z, Denes L, et al. Comparative detection of high-risk HPV (16, 18, 33) in cervical bioptic material of county hospital of Tg. Mures. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47(3): 229-34.
- [32] Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H, et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep* 2008; 19(2): 457-65.
- [33] Boonyanurak P, Panichakul S, Wilawan K. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus Infection (HPV) and Correlation with Postmenopausal Hormonal Therapy in Thai Women Aged More Than 45 Years Old. *J Med Assoc Thai* 2010; 93(1): 9-16.
- [34] Ryan M. USMLE Step Three Recall *Lippincott Williams & Wilkins* 2003. p. 247.
- [35] Bhattarakosol P, Poonnaniti A, Niruthisard S: Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. *J Med Assoc Thai* 1996; 79 Suppl 1: S56-64.
- [36] Ramdas Chatterjee, Biplab Mandal and Sarmistha Bandyopadhyay. Detection of HPV DNA in Cervical Carcinomas after Treatment in India. *Int J Hum Genet* 2005; 5(1): 27-31.
- [37] Giles M, Garland S. Human papilloma virus infection: an old disease, a new vaccine. *J Aust N Z Obstet Gynecol* 2006; 46(3): 180-5.