Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(96): 28-36

Molecular Recognition of Human Papilloma Virus (HPV) Using Proprietary PCR Method Based on L_1 Gene and the Evaluation of its Frequency in Tissue Samples from Patients with Cervical Cancer

Roohollah Dorostkar[1*], Mohammad Sadegh Hashemzadeh[1], Mahdi Tat[1], Mohammad Raza Shafaati[1], Mohammad Najar Asl[1], Samaneh Zahiri Yeganeh[1]

1- Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 8 Nov 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: In 1970, human papillomavirus (HPV) was introduced as the main etiologic factor of cervical carcinoma. Since there is no possibility of detecting the virus and its subtypes using serological methods and cell culture, the molecular methods such as PCR have particular importance in accurate, early and definite diagnosis of the virus. So, in this research, our goal is to use a proprietary PCR assay based on L_1 gene of human papillomavirus for molecular recognition of HPV and to evaluate its prevalence in patient samples.

Materials and Methods: In this experimental study, after collecting of samples from malignant cervical lesions, the viral DNA was extracted from paraffin blocks of 50 clinical samples and PCR was done by specific primers for L_1 gene of human papillomavirus in all samples. After the analysis of PCR products by 2% agarose gel electrophoresis, sensitivity and specificity of the test were also evaluated.

Results: Among 50 patient samples, 33 cases were confirmed to be positive for HPV infection and 17 cases were negative, showing high frequency of HPV in this patient population (about 66%). The results of specificity assay were positive for papilloma samples and sensitivity of the assay was 20 copies of recombinant construct containing L_1 per reaction.

Conclusion: This study showed that PCR by specific primers for L_1 gene of human papilloma virus is a proper and accurate method for detection of this virus and the results confirm the previous reports of correlation between HPV and cervical carcinoma.

Keywords: Cancer of cervix, Human Papilloma Virus, PCR

*Corresponding Author:
Address: Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: R.dorost@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۳ (شماره پیاپی۹۶)، خرداد ۱۳۹۴، ۳۶-۲۸

تشخیص مولکولی ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) با استفاده از PCR اختصاصی بر روی ژن L_1 و بررسی فراوانی آن در نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان دهانه رحم

روح الله درستکار[1*]، محمد صادق هاشم زاده[2]، مهدی تات[3]، محمدرضا شفاعتی[4]، محمد نجاراصل[3]، سمانه ظهیری یگانه[4]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد علوم سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۷تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: در سال ۱۹۷۰ میلادی، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به عنوان عامل اصلی بروز سرطان دهانه رحم معرفی شد. از آن جا که با استفاده از روش‌های سرولوژیک و کشت سلولی، امکان تشخیص این ویروس و انواع آن وجود ندارد، روش های مولکولی از جمله PCR در تشخیص دقیق، قطعی و زودهنگام این ویروس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. لذا هدف از این پژوهش، استفاده از یک سنجش PCR اختصاصی بر روی ژن L_1 ویروس پاپیلومای انسانی، جهت تشخیص مولکولی HPV و بررسی وفور آن در نمونه‌های بیمار می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری نمونه از ضایعات بدخیم دهانه رحم بیماران مختلف، DNA ویروسی از بلوک‌های پارافینی ۵۰ نمونه بالینی، استخراج شد و PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن L_1 ویروس پاپیلومای انسانی، بر روی نمونه‌های فوق انجام گرفت و پس از بررسی محصولات PCR تولید شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد، حساسیت و اختصاصیت این تست نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان ۵۰ نمونه بیمار، ۳۳ مورد از نظر وجود عفونت HPV مثبت و ۱۷ مورد HPV منفی بودند که حاکی از فراوانی بالای HPV در این جمعیت بیمار (حدود ۶۶ درصد) بود. نتایج ارزیابی اختصاصیت برای نمونه‌های پاپیلوما مثبت بوده و حساسیت این تست، ۲۰ نسخه از سازه نوترکیب حاوی L_1 به ازای هر واکنش بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که PCR با پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن L_1 روشی مناسب و دقیق برای ردیابی ویروس پاپیلومای انسانی است و این یافته‌ها موید گزارش های پیشین مبنی بر ارتباط میان HPV و سرطان دهانه رحم است.

واژگان کلیدی: سرطان دهانه رحم، ویروس پاپیلومای انسانی، PCR

* **نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی

Email: R.dorost@yahoo.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم دومین علت مرگ و میر در اثر سرطان در بین زنان می‌باشد. در این سرطان بیش از هر نوع بدخیمی دیگری، اثرات پیش‌گیری، تشخیص زودرس و درمان به موقع بر کاهش میزان مرگ و میر مشهود است. اتیولوژی و پاتوژنز دهانه رحم شامل عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی است که منجر به ترانسفرماسیون سلول‌های اپی تلیالی می‌شود. مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین علل محیطی ایجاد این سرطان، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) می‌باشد که در سال ۱۹۷۰میلادی به عنوان عامل اصلی بروز سرطان دهانه رحم معرفی گردید و مطالعات مختلف صورت گرفته در سراسر جهان نشان دهنده ارتباط قوی میان HPV و تغییرات پیش سرطانی و سرطانی در سلول‌های اپی تلیالی می‌باشند(۱). سایر عوامل محیطی ایجاد این سرطان شامل سن پایین به هنگام اولین مقاربت، مقاربت‌های مکرر، داشتن شرکای جنسی متعدد، مصرف قرص ضد بارداری خوراکی و کشیدن سیگار می‌باشد. تاکنون در حدود ۸۰ زیر گروه از این ویروس شناخته شده‌اند که ۲۰ نوع آنها در ایجاد سرطان دهانه رحم درگیر هستند. برخی از آنها عبارت‌اند از: زیرگروه‌های ۱۶، ۱۸، ۲۵، ۳۳ (۲). خوشبختانه اکثر تغییرات القایی ناشی از ویروس گذرا بوده و حدود ۹۰ درصد این عفونت ظرف مدت یک تا سه سال در اثر فعالیت سیستم ایمنی کاملاً بهبود می‌یابد و تنها در ۱۰ درصد از زنانی که عفونت آنها به شکل دائمی در می‌آید، ضایعات پیش سرطانی و سرطانی ایجاد می‌شود(۳). اما به نظر می‌رسد که سرطان دهانه رحم در کشورهای در حال توسعه به علت به اجرا نگذاشتن برنامه‌های غربال‌گری مناسب به تدریج روبه افزایش باشد(۴). با مشخص شدن این که تیپ‌های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی عامل اصلی سرطان دهانه رحم بوده و تشخیص به موقع و درمان سریع این عفونت‌ها می‌تواند از پیشرفت ضایعات ایجاد شده به حالت سرطانی شدن ممانعت و جلوگیری نماید، می‌توان به راحتی به اهمیت و جایگاه تشخیص این گونه عفونت‌ها در غربال‌گری و اقدامات معمول بالینی پی‌برد(۵، ۶). اگرچه در مورد انجام عمل تشخیص HPV در غربال‌گری‌های اولیه سرطان دهانه رحم هنوز بحث‌هایی وجود دارد، لیکن امروزه الگوریتم‌ها و برنامه‌های جدیدی مبتنی بر غربال‌گری اولیه این ویروس آغاز شده و به اجرا درآمده است، چرا که آزمایش معمول و قدیمی پاپ اسمیر علاوه بر محدودیت‌های متعدد، از لحاظ حساسیت تشخیصی نیز نسبت به روش تشخیص مولکولی HPV از جایگاه پایین‌تری برخوردار است(۱۰-۷). تست‌های متداول تشخیصی HPV بر ردیابی DNA در طیف وسیعی از انواع تیپ‌های HPV در یک آزمایش منفرد متکی هستند(۱۱). روش‌های متعددی برای نیل به این هدف توسعه یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به روش‌های Hybrid Capture II و PCR مبتنی بر توالی‌های حفظ شده اشاره نمود. اما چون فقط تیپ‌های پرخطر ویروس پاپیلومای انسانی باعث سرطان دهانه رحم می‌شوند، ضروری است که نوع تیپ‌های HPV در نمونه‌های سرطانی تعیین گردند(۱۲). روش‌های مختلفی نظیر RFLP هیبریداسیون معکوس و تعیین توالی مستقیم جهت تعیین ژنوتیپ‌های این ویروس به کار برده شده‌اند(۱۲). اما روش نسبتاً ساده و اقتصادی جهت تعیین تیپ‌های HPV ، استفاده از PCR اختصاصی برای هر تیپ است(۱۱، ۱۳). اگرچه تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۳۳ به عنوان شایع‌ترین تیپ‌های سرطان‌زا در جهان معرفی شده‌اند، لیکن این تیپ‌ها همیشه به عنوان شایع‌ترین تیپ‌ها گزارش نشده‌اند(۱۱، ۱۴، ۱۵). بر این اساس ضروری به نظر می‌رسد که شایع‌ترین تیپ‌های HPV در هر جمعیت به صورت جداگانه تعیین گردیده تا بتوان از آنها برای طراحی یک برنامه غربال‌گری موثر، مدیریت بیماری و در نهایت واکسیناسیون جمعیت هدف برعلیه تیپ‌های ویروسی شایع در همان جمعیت استفاده کرد. از آن جا که با استفاده از روش‌های سرولوژیک و کشت سلولی، امکان تشخیص این ویروس و انواع آن وجود ندارد، در تشخیص دقیق، قطعی و زودهنگام این ویروس، روش‌های مولکولی از جمله PCR از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند(۱۶) و مطالعات مروفولوژیک نیز حتی با اعمال تکنیک‌های نوین مانند Liquid-based به تنهایی حساسیت خیلی بالایی برای

تشخیص ندارند(۱۷). لذا در این پژوهش، از یک سنجش PCR اختصاصی بر روی ژن L_1 ویروس پاپیلومای انسانی، به منظور تشخیص مولکولی HPV و بررسی وفور آن در نمونه‌های بیمار دارای ضایعات سرطانی دهانه رحم، معرفی شده از آزمایشگاه‌های آسیب شناسی تهران، استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

۱) جمع‌آوری نمونه: در این مطالعه که به روش تجربی (آزمایشگاهی) انجام شد، تعداد ۵۰ نمونه بافتی مربوط به ضایعات بدخیم دهانه رحم بیماران مختلف از آزمایشگاه‌های آسیب‌شناسی در سطح شهر تهران جمع‌آوری گردید. نمونه‌های ویروسی دیگری حاوی آدنوویروس، سایتومگالوویروس و هرپس ویروس، جهت بررسی اختصاصیت این روش، از بیمارستان بقیه الله الاعظم(عج) تهیه شد.

۲) استخراج ژنوم ویروسی: استخراج DNA ویروسی، با استفاده از کیت تجاری استخراج نوکلئیک اسید (اینترون، کره) از بلوک‌های پارافینی ۵۰ نمونه بالینی، انجام شد. نمونه‌های استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شدند و میزان خلوص آنها بر اساس نسبت A_{260}/A_{280} مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳) طراحی و سنتز پرایمرها و بهینه سازی شرایط انجام واکنش PCR: پس از طراحی یک جفت پرایمر با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 6, USA) CLC Main) و بررسی آن‌ها به لحاظ ترمودینامیکی، این توالی‌ها توسط شرکت سیناژن سنتز شدند. این جفت پرایمر قطعه‌ی ۴۵۰ جفت بازی از ژن L_1 را شناسایی و تکثیر می‌نمایند که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن L_1 ویروس پاپیلومای انسانی

نام پرایمر	توالی
L_1-F	5'-CGTCCACAAGAGGGAATACTGATC-3'
L_1-R	5'-GCACCAGGGATTAACTAATGG-3'

در این مطالعه، هر واکنش PCR حاوی پرایمر اختصاصی (با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار به ازای هر کدام)، dNTP (با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار به ازای هر باز)، $MgCl_2$ (با غلظت نهایی ۲/۵ میکرومول) و آنزیم DNA پلیمراز Taq (فرمنتاز)(با غلظت نهایی ۰/۷۵ u) بود. سیکل‌های حرارتی واکنش PCR در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. سیکل‌های حرارتی واکنش PCR

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴درجه	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۴ درجه	۴۵ ثانیه	۴۰
اتصال	۵۵ درجه	۳۰ ثانیه	
پلیمریزاسیون	۷۲ درجه	۳۰ ثانیه	
پلیمریزاسیون نهایی	۷۲ درجه	۷ دقیقه	۱

پس از انجام PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول هر واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی $\mu g\ ml^{-1}$ ۰/۰۵ از ژل قرمز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج توسط دستگاه BioDoc Analyzer (کیا ژن) به صورت فایل دیجیتالی ثبت شد.

٤) بررسی ویژگی (اختصاصیت) سنجش PCR: برای بررسی اختصاصیت واکنش PCR، این واکنش با استفاده از پرایمرهای مذکور بر روی ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی به عنوان نمونه اصلی و نمونه‌های ویروسی دیگری حاوی ژنوم آدنوویروس، سایتومگالوویروس و هرپس ویروس انجام گرفت.

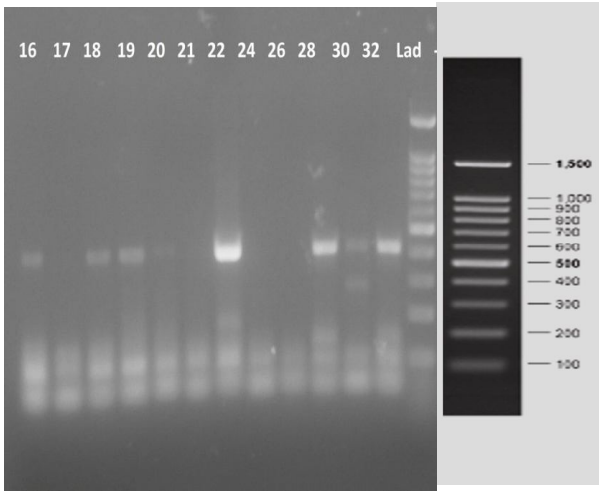
۵) تولید سازه نوترکیب حاوی ژن L_1 به عنوان کنترل مثبت و نیز برای تعیین حساسیت واکنش: عمل همسانه سازی قطعه ۴۵۰ جفت بازی ژن L_1، با استفاده از کیت T/A کلونینگ کمپانی فرمنتاز در وکتور $pTZ_{57}R$ انجام پذیرفت. محصول PCR مستخرج از ژل، مستقیماً برای عمل همسانه سازی استفاده گردید. با استفاده از محیط C-medium این کیت، سلول‌های مستعد از سویه DH5α باکتری اشرشیاکلی آماده شد. سپس عمل الحاق با استفاده ازکیت مذکور انجام گرفت. مخلوط واکنش الحاق به مدت

چهار ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. بعد از انجام پروتکل مربوطه، مرحله تراریختی به داخل سویه‌های مستعد از قبل آماده شده، انجام شد. کلنی‌های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر)، هم‌چنین ماده X-Gal (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و IPTG (با غلظت ۴۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) انتخاب شدند. این کلنی‌های سفید بایستی حاوی ژن مورد نظر باشند. برای تأیید همسانه سازی، تعداد ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی پلیت LB آگار (لیکوفیلکام، ایتالیا) حاوی آمپی سیلین انکوبه گردید. سپس بر روی کلنی‌های فوق، PCR مستقیم با پرایمرهای اختصاصی گذاشته شد و مشخص شد که تمامی این کلنی‌ها واجد قطعه مورد نظر ما بوده‌اند، از این رو دو کلنی از آنها به صورت تصادفی انتخاب شدند و پلاسمید آنها با استفاده از کیت استخراج پلاسمید اینترون (اینترون، کره) استخراج گردید. از همین پلاسمید به عنوان کنترل مثبت و همین طور برای تعیین حساسیت سنجش استفاده شد.

٦) ارزیابی حد نهایی تشخیص (حداقل میزان تشخیص یا حساسیت) سنجش PCR: همان طور که گفته شد، قطعه ۴۵۰ جفت بازی ژن L_1، در وکتور کلونینگ $pTZ_{57}R$ همسانه سازی گردید و سازه نوترکیبی با نام $pPap_{450}$ تهیه شد. برای تعیین حساسیت واکنش، رقت‌های سریالی از سازه نوترکیب $pPap_{450}$ حاوی ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰ و ۲۵۶۰ کپی در هر واکنش سنجشی تهیه گردید و به دنبال آن PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن L_1 بر روی هر کدام از رقت‌ها انجام گرفت. این بررسی حداقل توسط سه کاربر مختلف و با سه بار تکرار، توسط هرکدام از آنها طی سه روز مختلف، انجام گرفت. بالاترین رقتی که تمامی واکنش‌های انجام شده بر روی آن مثبت بود، به عنوان حد نهایی تشخیص در نظر گرفته شد.

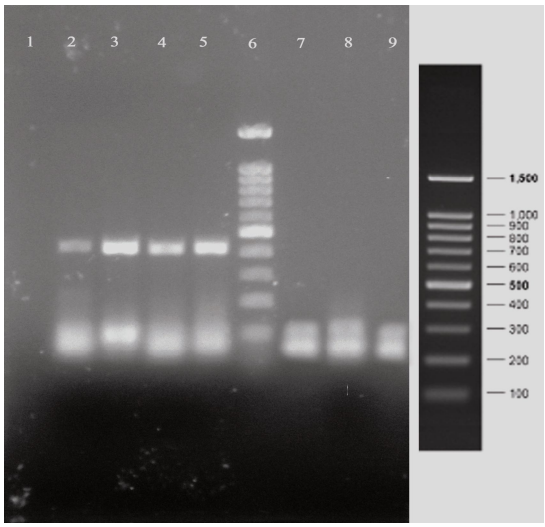
یافته‌ها

۱) ارزیابی نمونه‌های بافتی جدا شده از ضایعات بدخیم دهانه رحم: در جمعیت مورد مطالعه ما (۵۰ مورد)، ۳۳ مورد از نظر وجود HPV مثبت و ۱۷ مورد HPV منفی بودند. به عبارت دیگر میزان فراوانی عفونت HPV در این جمعیت بالا (حدود ۶۶ درصد) گزارش گردید (تصویر ۱).



تصویر۱ . نتایج بررسی تعدادی از نمونه‌های بافتی جدا شده از بیماران که در نمونه‌های HPV مثبت، قطعه ۴۵۰ جفت بازی قابل مشاهده است.

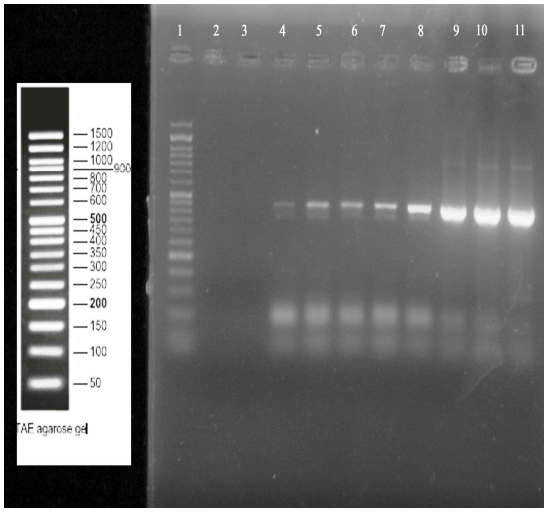
۲) ارزیابی ویژگی (اختصاصیت) سنجش PCR: نتیجه تست اختصاصیت PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن L_1، برای نمونه‌های پاپیلوما مثبت بود، در حالی که هیچ یک از نمونه‌های تهیه شده ویروسی دیگر (حاوی آدنوویروس، سایتومگالوویروس و هرپس ویروس) به وسیله این سنجش PCR تشخیص داده نشدند؛ نتایج فوق، اختصاصیت این تست را تأیید می‌کنند (تصویر ۲).



تصویر ۲. نتیجه آزمون بررسی ویژگی PCR. چاهک ۱: خالی؛ چاهک های ۲ تا ۵: قطعه ۴۵۰ جفت بازی حاصل از تکثیر DNA در نمونه‌های پاپیلوما؛ چاهک ۶: مارکر وزنیbp ۱۰۰ (سیناژن، ایران)؛ چاهک ۷: محصول بررسی نمونه آدنو ویروس فاقد قطعه مورد نظر؛ چاهک ۸: محصول بررسی نمونه هرپس ویروس فاقد قطعه مورد نظر؛ چاهک ۹: محصول بررسی نمونه سیتومگالو ویروس فاقد قطعه مورد نظر

۳- ارزیابی حد نهایی تشخیص (حداقل میزان تشخیص یا حساسیت) سنجش PCR:

رقت‌های سریالی از سازه نوترکیب $pPap_{450}$ حاوی ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰ و ۲۵۶۰ کپی در هر واکنش سنجشی، مورد بررسی قرار گرفتند. حساسیت این تست، ۲۰ کپی از سازه نوترکیب حاوی L_1 در هر واکنش سنجشی بود. این حد بالاترین رقتی است که تمامی واکنش‌های انجام شده بر روی آن، مثبت بود و به تعبیری بالاترین رقتی است که نتیجه مثبت واکنش در آن ۱۰۰ درصد تکرارپذیر بوده است و می‌تواند معیاری تقریبی از تعداد ویروس حاوی ژن فوق باشد. نتایج مربوط به تست حساسیت سنجی بر روی این رقت‌های سریالی از سازه نوترکیب فوق، در تصویر ۳ نشان داده شده است.



تصویر۳. نتیجه آزمون بررسی حساسیت PCR. چاهک ۱: مارکر وزنی ۵۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)؛ چاهک های ۲ تا ۱۱: نتایج بررسی رقت های سریالی از سازه نوترکیب pPap450 به ترتیب حاوی ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰، ۱۲۸۰ و ۲۵۶۰ کپی در هر واکنش سنجشی؛ بر طبق تصویر، چاهک شماره ۴ بیانگر حد تشخیص این روش می‌باشد که معادل ۲۰ کپی از سازه نوترکیب حاوی L1، در هر واکنش سنجشی می‌باشد.

بحث

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که برخی از انواع HPV که به تیپ‌های پرخطر معروفند، نقش مهمی در ایجاد سرطان دهانه رحم دارند؛ به طوری که این تیپ‌ها در بیش از ۹۹ درصد سرطان‌های دهانه رحم در جهان شناسایی شده‌اند(۲۰-۱۸). ولی متاسفانه آمار جامعی در مورد شیوع انواع انکوژن این ویروس در رابطه با سرطان گردن رحم در ایران وجود ندارد. محدودیت‌های موجود در تست‌های هیستولوژی (Pap-test) در پیش‌گویی سرطان دهانه رحم منجر به این شد که روش‌های حساس‌تر تعیین HPV هم‌چون روش‌های مبتنی بر PCR توسعه یابند. لیکن با توجه به مشکلات آزمون‌های عمومی هیستولوژی و مجهول بودن تشخیص در برخی از مراحل پیشرفت سرطان، تشخیص مولکولی این ویروس انکوژن ضروری به نظر می‌رسد(۲۱). در این پژوهش، از ۵۰ نمونه بافت دهانه رحم ، ۳۳ مورد از نظر وجود HPV مثبت و ۱۷ مورد HPV منفی بودند که نشان دهنده میزان آلودگی بالا با ویروس پاپیلوما انسانی

است (حدود ۶۶ درصد). میزان شیوع خام سالیانه کارسینوم مهاجم دهانه رحم در حدود ۱۷/۳ در هر صد هزار زن برای تمام سنین و ۲۷ در هر صد هزار زن برای سنین بالای ۲۰ سالگی می‌باشد(۲۲). در دو مطالعه‌ای که در اسپانیا و کلمبیا انجام شده بود(۲۵-۲۳)، DNA مربوط به HPV را در حدود ۷۵ درصد از موارد بیمار تشخیص داده بودند؛ هم‌چنین طی گزارش نیاکان و همکاران که در سومین کنگره سراسری میکروبیولوژی ایران (شهریور ۱۳۷۹) در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی همدان ارائه گردید، میزان موارد مثبت از نظر حضور ژنوم ویروس HPV در ضایعات دهانه رحم ۷۰ درصد گزارش شد که البته در آن مطالعه از روش هیبریداسیون مولکولی استفاده شده بود. مطالعات اپیدمیولوژیک، مهم‌ترین عوامل خطر برای ایجاد سرطان دهانه رحم، بعد از HPV را ۱) سن پایین به هنگام اولین مقاربت، ۲) وجود شرکای جنسی متعدد و ۳) تعدد مقاربت می‌دانند. در ادامه از عوامل دیگر می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: ۴) تعداد بارداری‌ها و پیدایش اولین بارداری در سنین پایین و قبل از ۱۸ سالگی، ۵) تماس جنسی با مردان پرخطر (مردانی که با زنان متعدد تماس جنسی دارند)، ۶) مصرف قرص‌های ضد بارداری خوراکی، ۷) کشیدن سیگار، ۸) وضعیت اجتماعی و اقتصادی پایین، ۹) عدم رعایت بهداشت تناسلی و ۱۰) مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی(۲۶، ۲۷). 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(۲۸) و احتراز از رفتارهای پرخطر و رعایت نکات بهداشت فردی و اجتماعی می‌تواند تأثیر بسزایی در جلوگیری از ایجاد عفونت HPV و متعاقباً ضایعات پیش سرطانی و سرطانی این بافت داشته باشد. طی سال‌های اخیر، توجه مراکز علمی دنیا به تولید واکسن ضد ویروس HPV افزایش یافته است(۲۷) و با توجه به وفور نسبتاً بالای ویروس در بافت‌های مبتلا به سرطان در کشور ما، می‌توان در آینده از واکسن ضد ویروس در جمعیت پرخطر استفاده کرد. هم‌چنین انواعی از داروهای اینترفرون در درمان ضایعات مرتبط با عفونت HPV استفاده می‌شود(۲۷) که لازمه استفاده از این درمان، تشخیص وجود عفونت در بافت‌های مبتلاست؛ لذا به نظر می‌رسد که انجام آزمایش‌های مولکولی به همراه سایر بررسی‌ها در ضایعات پیش سرطانی و سرطانی دهانه رحم و حتی اسمیرهای سرویکوواژینال (پاپ اسمیر) که مشکوک به عفونت HPV هستند، ضروری است.

نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع عفونت HPV در میان زنان جوان مبتلا به سرطان دهانه رحم و وجود دوره طولانی مدت پیش سرطانی در سرطان دهانه رحم، بررسی تمام زنان بالای ۲۰ سال از نظر سیتولوژیک و هم‌چنین بررسی موارد مشکوک از نظر وجود ویروس پاپیلومای انسانی پیشنهاد می‌شود. توجه به این امر می‌تواند منجر به تشخیص به موقع و انجام تدابیر پزشکی مناسب شده و از پیشروی تغییرات سلولی اولیه به سمت دیسپلازی سرویکس جلوگیری نماید. از آن جایی که کشت سلولی HPV امکان‌پذیر نمی‌باشد، بهترین روش برای بررسی وجود عفونت HPV استفاده از روش‌های مولکولی مثل PCR، DNA probs و Hybrid Capture 2 (HC2)است که در مدت زمانی کوتاه قادر به آشکارسازی HPV در نمونه‌های بیوپسی دهانه رحم می‌باشند(۹). این مطالعه نشان داد که PCR با پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن L_1 روشی مناسب، دقیق، حساس و دارای اختصاصیت، برای ردیابی ویروس پاپیلومای انسانی است و نتایج حاصله از این تحقیق، گزارش‌های پیشین مبنی بر ارتباط میان HPV و سرطان دهانه رحم را تأیید می‌نمایند. بنابراین استفاده از این روش در کنار تست غربال‌گری پاپ اسمیر در افرادی که دچار دیسپلازی می‌باشند، مفید بوده و توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از ریاست محترم مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی و همکاران گرامی در

بخش بیولوژی مولکولی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) به خاطر مساعدت‌هایشان تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1. Baliga MS, Dsouza JJ. Amla (Emblica officinalis Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. European Journal of Cancer Prevention. 2011;20(3):225-39.
2. Roberts CC, Tadesse AS, Sands J, Halvorsen T, Schofield TL, Dalen A, et al. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. Journal of clinical virology. 2006;36(4):277-82.
3. Yee CJ, Lin O, Boyd J. Analysis of fibroblast growth factor receptor 3 S249C mutation in cervical carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(22):1848-9.
4. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2001;10(10):1021-7.
5. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. The Journal of experimental medicine. 1988;167(1):225-30.
6. Bosch F, Lorincz A, Munoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. Journal of clinical pathology. 2002;55(4):244-65.
7. Tornesello ML, Duraturo ML, Botti G, Greggi S, Piccoli R, De Palo G, et al. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. Journal of medical virology. 2006;78(12):1663-72.
8. De Silva R, Karunaratne K, Mendis LN, Ramesh R, Chow V. PCR detection and typing of human papilloma virus DNA in squamous carcinoma of the cervix in a cohort of Sri Lankan women. The Ceylon medical journal. 2006;51(3):114-7.
9. Eslami G, Golshani M, Rakhshon M, Fallah F, Goudarzi H. The study on relation of Human Papillomavirus with bladder transitional cell carcinoma. Cancer Therapy. 2008;6:355-60.
10. Eslami G, Golshani M, Rakhshan M, Fallah F, Goudarzi H. Detection of Human Papiloma Virus among Women with Cervical Cancer Using PCR Method. Pajoohandeh Journal. 2008; 13(3):231-7.
11. Peedicayil A, Abraham P, Sathish N, John S, Shah K, Sridharan G, et al. Human papillomavirus genotypes associated with cervical neoplasia in India. International Journal of Gynecological Cancer. 2006;16(4):1591-5.
12. Rajaram S, Gupta G, Agarwal S, Goel N, Singh K. High-risk human papillomavirus, tumor suppressor protein p53 and mitomycin-C in invasive squamous cell carcinoma cervix. Indian journal of cancer. 2006;43(4):156-7.
13. Konidaris S, Kouskouni EE, Panoskaltsis T, Kreatsas G, Patsouris ES, Sarivalassis A, et al. Human papillomavirus infection in malignant and benign gynaecological conditions: a study in Greek women. Health care for women international. 2007;28(2):182-91.
14. You K, Liang X, Qin F, Guo Y, Geng L. High-risk human papillomavirus DNA testing and high-grade cervical intraepithelial lesions. Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology. 2007;47(2):141-4.
15. Ozsaran A, Dikmen Y, Akercan F, Zekioglu O, Terek M, Mgoyi L, et al. The triage of squamous cell abnormalities of cervical cytology by human papilloma virus screening. European journal of gynaecological oncology. 2002;24(6):535-8.
16. Lazo P. The molecular genetics of cervical carcinoma. British journal of cancer. 1999;80(12):2008-1.
17. Zanotti KM, Kennedy AW. Screening for gynecologic cancer. Medical Clinics of North America. 1999;83(6):1467-87.
18. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. Canadian Medical Association Journal. 2001;164(7):1017-25.
19. 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. The Journal of pathology. 1999;189(1):12-9.
20. Lorincz AT, Reid R, Jenson BA, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstetrics & Gynecology. 1992;79(3):328-37.
21. Jabarpour M, Esmaeili M, Dastran A. Multiplex PCR to determine the types of human papillomavirus oncogenes in cervical cancer lesions in North West Iran. Iranian Journal of Infectious Diseases. 2000; 41(13): 6-7.[persian]
22. Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Journal of the National Cancer Institute. 2003;95(6):E2-E.
23. Li S, Meng Y-H, Ting H, Shen J, Ma D. Clinical significance of human papilloma virus infection in the cervical lesions. Frontiers of medicine in China. 2010;4(3):264-70.
24. Bazuaye PE. Cervical dysplasia in jamaican women: lifestyle and genetic factors: Mona: The University of the West Indies; 2006.
25. Castle PE, Giuliano AR. Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients—assessing their roles as human papillomavirus cofactors. JNCI Monographs. 2003;2003(31):29-34.
26. Mostafavizadeh SM, Niakan M, Ahmadi A, Aghabozorgi S, Lak R, Azimi SA, et al. Frequency distribution of HPV18 based on the detection of E6 oncoprotein gene in cervix cancer samples. KAUMS Journal (FEYZ). 2013;17(3):287-93.
27. Keyhani E, Kohannia N, Izadimood N, Keyhkhaee M, Najmabadi H. The prevalence of human papilloma virus (HPV) in malignant cervical lesion, using multiplex PCR. Tehran University Medical Journal. 2006;64(3):95-101.
28. McNair R, Power J, Carr S. Comparing knowledge and perceived risk related to the human papilloma virus among Australian women of diverse sexual orientations. Australian and New Zealand journal of public health. 2009;33(1):87-93.