

بررسی پاپیلوما ویروس انسانی در افراد مبتلا به سرطان مثانه و گروه شاهد با روش PCR

دکتر گیتا اسلامی*، مریم گلشنی*، دکتر محمد رخشان**، دکتر فاطمه فلاح*، دکتر حسین گودرزی*، افسون تقوی**

* گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه تناسلی - ادراری در جهان است و شیوع آن در مردان حدود ۳ برابر زنان است. عوامل کارسینوژنیک و ریسک فاکتورهای متعددی در ایجاد این سرطان دخیل می‌باشند که از میان آنها نقش عفونتهای ویروسی، به خصوص پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) در سالهای اخیر بسیار مورد بحث قرار گرفته است. هدف تحقیق حاضر بررسی نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به سرطان مثانه و گروه کنترل در جهت یافتن ژنوم HPV ژنیتال و شناسایی تیپهای شایع آن در ایران بوده است.

روش بررسی: در این تحقیق با اخذ نمونه بیوپسی مثانه از ۱۸۶ بیمار (۱۴۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۳۹ نفر بعنوان گروه کنترل) و بررسی نمونه‌ها با روش PCR فراوانی HPV و نوع تیپ آن تعیین شد. یافته‌ها: ۳۴/۷٪ از افراد مبتلا به سرطان مثانه و ۷/۶٪ افراد گروه کنترل از نظر HPV مثبت بودند. تیپ HPV18 تیپ غالب یافت شده بود (۴۷٪). نسبت مردان مبتلا به سرطان مثانه تقریباً ۶ برابر زنان بود و اکثر بیماران مرد در Stage و Grade بالای سرطان قرار داشتند. بررسی طبقه‌بندی سنی بیماران حاکی از آن است که گروه سنی ۶۰-۵۱ سال بیشترین موارد ابتلا به سرطان مثانه را به خود اختصاص داده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به درصد قابل توجه موارد HPV مثبت در میان افراد مبتلا به سرطان مثانه در مقایسه با گروه کنترل، به نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین سرطان مثانه و عفونت HPV در ایران وجود دارد.

واژگان کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی، سرطان مثانه، PCR.

مقدمه

سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه تناسلی - ادراری در بزرگسالان محسوب شده و در بعضی از مناطق جهان، مثل آفریقا، شایعترین سرطان بشمار می‌آید. این سرطان چهارمین سرطان شایع در مردان و هشتمین نوع سرطان در زنان است. در کشورهای صنعتی مثل آمریکا، کانادا و فرانسه بیش از ۹۰٪

موارد سرطان مثانه از نوع TCC است اما در کشورهای در حال توسعه ۹۵٪ موارد سرطان مثانه از نوع SCC است که توسط شیستوزوما ایجاد می‌شود. بیشترین موارد سرطان مثانه بر اساس گزارشات موسسه ملی سرطان آمریکا (NCI)، در کشورهای صنعتی و کمترین موارد در آسیا و آمریکای جنوبی اتفاق می‌افتد (۱، ۲). عوامل کارسینوژنیک و کوکارسینوژنیک متعددی در ایجاد کارسینوما مثانه دخیل می‌باشند که از جمله آنها می‌توان به سن، جنس (نسبت ابتلا در مردان ۳ برابر زنان)، استعمال دخانیات، مصرف الکل، نوع شغل افراد (مثال کارگران صنایع شیمیایی، رنگ‌سازی، نفت و ...)،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، دکتر گیتا اسلامی (سرنام: g_eslami@yahoo.com) (email: g_eslami@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۵/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۸/۶

تعداد این گیرنده‌ها بر روی سلولهای مهاجم بیشتر بوده و در نتیجه تجزیه غشاء و ترشح سیتوکاین تهاجم و متاستاز صورت می‌گیرد. سیستم‌های طبقه‌بندی سرطان مثانه را بر اساس میزان پیشرفت و شدت بیماری به چندین Stage (I,II,III) Grade و سه (Ta,T1,T2,T3,T4) تقسیم نموده‌اند (۱، ۱۱-۹).

از لحاظ علائم بالینی در ۹۰-۸۵٪ بیماران هم‌اچوری متناوب اولین تظاهر بوده در مواردی تحریک مثانه مثل تکرر ادرار، احساس فوریت در دفع ادرار و دیزوری، خصوصاً در بیماران مبتلا به CIS دیده می‌شود. در مراحل پیشرفته‌تر بیماری، دردهای استخوانی یا درد پهلو به علت متاستاز دیده می‌شود (۱، ۱۱).

از آنجایی که HPV در کشت سلولی قادر به رشد نیست و تستهای Ab هم در مواردی خاص و تنها در آزمایشگاههای تحقیقاتی موجود می‌باشند، می‌توان در کنار سایر تستهای آزمایشگاهی روتین و تصویربرداری و غیره که در تشخیص سرطان استفاده می‌شود، با استفاده از انواع روشهای تشخیصی بیولوژی مولکولی وجود HPV را در نمونه بالینی ثابت نمود (۱).

بنابراین در این مطالعه، با توجه به امکان نقش عفونت‌های آنوزینتال HPV بعنوان یک ریسک فاکتور مهم در ایجاد سرطان مثانه، نمونه بیوپسی مثانه بیماران مبتلا با روش PCR، از نظر وجود ژنوم HPV و شناسایی تیپ‌های شایع آن بررسی شدند. سایر متغیرها شامل سن بیماران مبتلا به سرطان مثانه و گروه کنترل و همچنین Grade و Stage سرطان در افراد مبتلا مشخص شد.

مواد و روشها

نمونه‌های بیوپسی پارافینه ۱۴۷ نفر از بیماران مبتلا به سرطان مثانه و ۳۹ فرد سالم بعنوان گروه کنترل، جمع‌آوری شد. افراد مورد کسانی بودند که وجود سرطان مثانه در آنها محرز بوده و در درجات و مراحل مختلف سرطان قرار داشتند. این افراد پس از بررسی مجدد و تایید پاتولوژیست وارد مطالعه شدند. افراد شاهد کسانی بودند که بدلیل داشتن برخی علائم بالینی مشکوک به سرطان بوده اما بعد از بررسیهای پاتولوژیک، عدم ابتلا آنها به سرطان اعلام شده بود.

برای استخراج DNA، ابتدا برش نازکی از بلوک پارافینه که حاوی نمونه بیوپسی بود، تهیه شد. سپس پارافین اطراف نمونه توسط تیغ برداشته و پارافین باقیمانده طی مراحل با استفاده از گزین حذف شد و توسط الکل اتیلیک با غلظتهای کاهش

مصرف طولانی مدت داروهای مسکن و ضدسرطان، تماس با موادی مثل بنزیدین، هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک‌آروماتیک، تماس با آرسنیک (در منابع آبی)، عفونت شیستوزومی، عفونت آنوزینتال با HPV (Human papiloma virus) و یک سری وقایع ناشناخته کروموزومی، اشاره نمود (۷-۱).

از میان این عوامل نقش و ارتباط عفونت ژنیتال HPV در کارسینوم مثانه و نقش آن در پیشرفت سرطان مورد نظر این تحقیق بوده است. مطالعات فراوان در نقاط مختلف جهان، نشان‌دهنده ارتباط عفونت آنوزینتال HPV تیپ ۱۶ و ۱۸ با سرطان مثانه است. از آنجائی‌که HPV16 و HPV18 دارای انکوژن‌های شناخته شده‌ای هستند که پروتئینهای E6 و E7 را سنتز می‌نمایند (۳) این پروتئینها قادر به اتصال به فاکتورهای ضدتوموری سلولی مثل P105RB و P53 بوده و در نهایت با مهار عملکرد این پروتئینها، باعث نامیرا شدن سلول می‌گردند. از میان تیپ‌های مختلف HPV، تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۵ و بعضی از ساب‌تیپ‌های تیپ ۵۰ در سطوح اپیتلیال ژنیتال یافت می‌شوند. تیپ‌های HPV بر اساس پتانسیل انکوژنیک خود به ۳ طبقه تقسیم می‌شوند: ریسک پایین (تیپ ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۹، ۵۶، ۶۶، ۶۸ و ۷۰)، ریسک متوسط (تیپ ۳۰، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۹، ۴۰، ۴۹، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۷، ۵۸، ۶۳ و ۶۴) و ریسک بالا (تیپ ۱۶، ۱۸، ۴۵ و ۴۶). تیپ‌های با ریسک بالا و متوسط به همراه سایر کوفاکتورها، مسئول بیش از ۹۰٪ موارد تومورهای آنوزینتال بدخیم می‌باشند. HPV قادر به ایجاد کوندیلوما اگومیناتوم (یک زخم آنوزینتال) در ناحیه تناسلی و مثانه است. این بیماری مقاربتی بوده و می‌تواند ریسک فاکتوری برای تغییرات ورقه‌ای در اپیتلیوم مثانه و در نتیجه ایجاد کارسینوما مثانه باشد (۸، ۷، ۳). چرخه تکثیر HPV به عوامل خاصی که در مراحل متوالی تمایز سلول اپیتلیال وجود دارند، وابسته بوده در نتیجه این ویروس تمایل خاصی به سلولهای اپیتلیال و مخاط داشته و با بیان انکوژن‌های خود، نقش آن در ایجاد بسیاری از سرطانهای انسانی مورد توجه است. از طرف دیگر تغییرات نئوپلاستیک در اوروتلیوم پدیده‌ای است چند مرحله‌ای که عامل آغازگر آن با تغییر در DNA سلول طبیعی باعث بدخیم شدن آن می‌گردد. تحقیقات مختلف با روشهای مولکولی نشان‌دهنده بیان انکوژن‌های HPV در انواع کارسینوم‌های مثانه می‌باشد. به طور کلی تغییر نئوپلاستیک ممکن است به شکل سرطان سطحی باقی بماند یا به حالت مهاجم و متاستاتیک تبدیل شود که این بستگی به وجود گیرنده لامینین غشاء سلول در سطح سلول توموری دارد که

در جداول ۲ و ۳ توزیع فراوانی بیماران بر حسب Grade و Stage آورده شده است.

جدول ۲- توزیع فراوانی بیماران بر حسب Grade سرطان

جنس	Grade			جمع
	III/IV	II	I	
مرد	۴۲	۶۰	۲۵	۱۲۷
زن	-	۶	۱۴	۲۰
جمع	۴۲	۶۶	۳۹	-

جدول ۳- توزیع فراوانی بیماران بر حسب Stage سرطان

جنس	Stage		جمع
	T2-T4	Ta-T1	
مرد	۷۳	۵۴	۱۲۷
زن	-	۲۰	۲۰
جمع	۷۳	۷۴	-

یافته آبدهی شد. در مرحله بعد، جهت استخراج DNA از نمونه بافت با استفاده از کیت DNP (ساخت شرکت سیناژن، ایران) انجام گرفت. در نهایت DNA استخراج شده تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

جهت بررسی وجود HPV در نمونه‌های بیوپسی از کیت HPV Screening (ساخت کمپانی Sacace، ایتالیا) و جهت تایید نتایج نمونه‌های مثبت از نظر وجود تیپ‌های پرخطر HPV از کیت HPV Typing (ساخت کمپانی Sacace، ایتالیا) که حاوی پرایمرهای اختصاصی جهت آشکارسازی ۱۴ تیپ HPV شامل ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹ و ۶۶ بود، استفاده شد. در نهایت آشکارسازی و عکس‌برداری محصولات PCR زیر نور UV، پس از الکتروفورز محصولات بمدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگار ۲٪ و ۳٪ حاوی ۱-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

یافته‌ها

گروه مورد شامل ۱۲۷ (۸۶/۴٪) مرد و ۲۰ (۱۳/۶٪) زن بود در حالیکه ترکیب گروه کنترل به صورت ۳۴ (۸۷/۲٪) مرد و ۵ زن (۱۲/۸٪) بود. توزیع سنی بیماران در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توزیع سنی افراد مورد و شاهد

گروه سنی (سال)	مورد		شاهد	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
زیر ۲۰	۲	۱/۴	-	-
۲۱-۳۰	۵	۳/۴	-	-
۳۱-۴۰	-	-	-	-
۴۱-۵۰	۲۰	۱۳/۶	۶	۱۵/۴
۵۱-۶۰	۴۴	۲۹/۹	۱۳	۳۳/۳
۶۱-۷۰	۳۴	۲۳/۱	۹	۲۳/۱
> ۷۰	۴۲	۲۸/۶	۱۱	۲۸/۲
جمع	۱۴۷	۱۰۰	۳۹	۱۰۰

در مجموع از ۱۴۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه، در ۵۱ نفر (۳۴/۷٪) HPV مثبت بود این در حالیست که این رقم در گروه کنترل ۳ نفر (۷/۶٪) بود.

توزیع فراوانی تیپ‌های HPV در ۵۱ بیمار مبتلا به سرطان مثانه به این صورت بود: ۱۹ نفر (۳۷/۲٪) HPV16، ۲۴ نفر (۴۷/۱٪) HPV18، ۱ نفر (۲٪) HPV31، ۶ نفر (۱۱/۷٪) HPV33 و ۱ نفر (۲٪) HPV51. در گروه کنترل نیز ۱ بیمار HPV16 و ۲ بیمار HPV18 بودند.

بحث

سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه تناسلی- ادراری در بزرگسالان محسوب شده و در بعضی از مناطق جهان مثل آفریقا، شایعترین سرطان بشماری‌آید. عوامل کارسینوژنیک و کوکارسینوژنیک متعددی در ایجاد کارسینوما می‌باشد که از آن میان نقش تیپ‌های پرخطر ویروس HPV مورد نظر این تحقیق بوده است.

در این مطالعه، از میان ۱۴۷ بیمار مبتلا به سرطان مثانه و ۳۹ نفر بعنوان گروه کنترل، بترتیب ۳۴/۷٪ و ۷/۶٪ HPV مثبت بودند. یافته‌های تحقیق ما موافق با یافته‌های تحقیق برقی است که شیوع HPV را در بیماران مبتلا به سرطان مثانه در ایران در سال ۲۰۰۵، ۳۵/۶٪ گزارش نموده بود (۱۲). با مقایسه نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان در می‌یابیم که میزان شیوع عفونت HPV در ایران در مقایسه با برخی کشورها مثل هلند (۱۵/۲٪)، یونان (۱۲٪)، آلمان (۱۹٪)، ترکیه (۴/۸٪) بیشتر بوده، اما از کشورهای مثل ایتالیا (۳۹/۵٪)، فنلاند (۵۷٪) و چین (۴۴٪) کمتر است (۱۹-۱۳). در توجیح این تفاوت می‌توان به وجود جو فرهنگی خاص در کشور ایران و پایبندی مردم به اصول اخلاقی و مذهبی اشاره نمود. با توجه به کمتر بودن میزان شیوع عفونت‌های منتقل شونده از راه جنسی (STIs)، از جمله عفونت HPV در میان ایرانیان خصوصاً در مقایسه با کشورهای غربی، درصد شیوع HPV در ایران کمتر از برخی کشورهای غربی مثل ایتالیا و فنلاند می‌باشد. در مقابل، در کشورهایی

بیماران در این مطالعه، شامل تیپ‌های ۳۱، ۳۳ و ۵۱ بودند. این یافته‌ها موافق با یافته‌های برخی محققان پیشین است (۱۲، ۱۶، ۱۹، ۲۱).

بررسی سن بیماران نشان‌دهنده آن بود که گروه سنی ۶۰-۵۱ سال و بیش از ۷۰ سال بیشترین تعداد افراد مبتلا به سرطان مثانه را تشکیل می‌دهند که این یافته‌ها تاحدودی همسو با یافته‌های برقی است که بیشترین تعداد افراد را در سنین ۵۲ و ۶۷ سال ذکر نموده است (۱۲).

دیگر یافته تحقیق حاضر در مورد شیوع بیشتر سرطان مثانه در مردان بود. بطوریکه تعداد بیماران مرد تقریباً ۴ برابر بیماران زن بود که این موافق با منابع موجود است که شیوع سرطان مثانه را در مردان ۳-۴ برابر زنان اعلام نموده‌اند (۱، ۲). همچنین بیماران مرد از نظر میزان پیشرفت سرطان در Grade و Stage بالاتری نسبت به زنان قرار داشتند. این مسئله احتمالاً بدلیل توجه بیشتر زنان به وضعیت سلامت خود و تشخیص زودرس بدخیمی‌ها در معاینات روتین آنها می‌باشد.

مثل آلمان که در بالا بدانها اشاره شد، بنظر می‌رسد بدلیل آگاهی بیشتر مردم نسبت به بهداشت جنسی خود، رعایت اصول پیشگیری و مراجعه بموقع به مراکز درمانی در صورت وجود مشکلات احتمالی و همچنین وجود برنامه‌های دقیق پیشگیری و کنترل بیماری در این کشورها در جهت کاهش ریسک عفونتهای جنسی مزمن، میزان شیوع HPV ژنیتال کمتر است.

با وجود مقالات متعدد در بیان وجود ارتباط بین HPV و سرطان مثانه، در مطالعات انجام شده در کشورهایی مثل فرانسه، انگلیس و آلمان هیچ ارتباط معنی‌داری بین این ویروس و سرطان مثانه یافت نشد (۲۰، ۱۸).

نتایج حاصل از تایپینگ نمونه‌های HPV مثبت نشان‌دهنده آن بود که HPV18 و HPV16 شایعترین تیپ جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان مثانه در ایران است. این یافته موافق با یافته‌های محققانی چون Kumel, Gaetani, Chent, Barghi و سایرین است که HPV18 و HPV16 را بعنوان تیپ انکوژنیک غالب HPV مرتبط با سرطان مثانه بیان نموده‌اند (۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۹). سایر تیپ‌های پرخطر HPV جدا شده از

REFERENCES

۱. - قاضی جهانی ب. در ترجمه: اورولوژی عمومی (اسمیت س، ریجوی د، مولفین). چاپ اول، انتشارات محاط، تهران، سال ۱۳۷۹، صفحات ۳۶۲ تا ۳۶۷.
2. www.urologychannel.com
3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, editors. Medical microbiology. 4th edition, Mosby Inc, USA, 2001;p:459-62.
4. Fioriti D, Pietropaolo V, Degenen AM. Urothelial bladder carcinoma and viral infections: different association with human papillomavirus and polyoma viruses. Int J Immuno Pathol Phormacol 2003;10:283-8.
5. Molwlo NG, kholaed HM. Bladder cancer in Africa: up date. Semin Oncol 2001;28:179-8.
6. Sur M, Allard U. Investigation of human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in south Africa. Pathology 2001;33:17-20.
7. Karagas MR, Parks F, Kelsey KT. Gender, smoking, glutathione -S- transferase variants and bladder cancer incidence. Cancer Lett 2005;219:63-9.
8. Baithun S, Olives RT. Squamous change in bladder cancer and its relevance to understanding clonal evolution in development of bladder cancer. Cancer Surv 2005;31:12-27.
9. Khaled HM, Bahnassr AA, Mokhtar N. Correlation between P53 mutations and HPV in bilharzial bladder cancer. Urol Oncol 2003;21:334-41.
10. Westra WH, Kiemeney LA, Trink B. CDC 91 L 1 (PIG -U) is a newly discovered oncogene in human an bladder cancer. Nat Med 2004;101:394-81.
11. www.National Cancer Institute.com
12. Barghi MR, Hajimohammad mehdiarbab A, Moghaddam SM, Kazemi B. Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma. BMC Infect Dis 2005;8(5):102.
13. Fioriti D, Pietropaolo V, Degenen AM. Urothelial bladder carcinoma and viral infections: different association with human papillumavirus and polyoma viruses. Int J Immuno Pathol Phormacol 2003;10:283-8.

14. Soultz N, Dokionakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism 8. Its association with bladder cancer. *Cancer Res* 2002;179:175- 83.
15. Chen T, Kong Q, Cao H. The study on relation of human papillomavirus and P53 expression with bladder transitional cell carcinoma. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2000;14(4):345-8.
16. De Gaetani C, Ferrari G, Righi E, Bettelli S, Migaldi M, et al. Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridization. *J Clin Pathol* 1999;52:103-6.
17. Tekin MI, Tuncez S, Aki FT, Ozen H. Human papilloma virus associated with bladder carcinoma? Analysis by polymerase chain reaction. *Int J Urol* 1999;6:184-6.
18. Ludwig M, Köchel HG, Fischer C, Ringert RH, Weidner W. Human papillomavirus in tissue of bladder and bladder carcinoma specimens. A preliminary study. *Eur Urol* 1996;30:96-102.
19. Kamel D, Pääkkö P, Pöllänen R, Vähäkangas K, Lehto VP, Soini Y. Human papillomavirus DNA and abnormal p53 expression in carcinoma of the urinary bladder. *APMIS* 1995;103:331-8.
20. Boucher NR, Scholefield JH, Anderson JB. The etiological significance of human papillomavirus in bladder cancer. *Br J Urol* 1996;78:866-9.
21. Mincione GP, Messerini L, Saltutti C, Di Cello V, Dominici A, Giannelli E, et al. HPV and p53 in urinary bladder carcinoma. *Pathologica* 1994;86:244-6.