

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 تقی^{*}

* گروه میکروب‌شناسی، 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 ژنتیک و شناسایی تیپهای شایع آن در ایران بوده است.

روش بررسی: در این تحقیق با اخذ نمونه بیوپسی مثانه از ۱۴۶ 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٪ از افراد مبتلا به سرطان مثانه و ۷٪ افراد گروه کنترل از نظر HPV مثبت بودند. تیپ خالب یافت شده بود (۴٪). نسبت مردان مبتلا به سرطان مثانه تقریباً ۶ برابر زنان بود و اکثر بیماران مرد در Stage ۲ بالای سرطان قرار داشتند. بررسی طبقه‌بندی سنی بیماران حاکی از آن است که گروه سنی ۵۱-۶۰ 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، بهنظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین سرطان مثانه و عفونت HPV در ایران وجود دارد.

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

مقدمه

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 امریکا (NCI)، در کشورهای صنعتی و کمترین موارد در آسیا و امریکای جنوبی اتفاق می‌افتد^(۱،۲). عوامل کارسینوژنیک و کوکارسینوژنیک متعددی در ایجاد کارسینومای 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 میکروب‌شناسی، دکتر گیتا اسلامی (email: g_eslami@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۵/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۸/۶

بررسی HPV در افراد مبتلا به سرطان مثانه با روش PCR

تعداد این گیرندها 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 Stage میزان پیشرفت و شدت بیماری به چندین Grade (I,II,III,IV) تقسیم نموده‌اند (۹-۱۱).

از لحاظ علائم بالینی در ۹۰-۸۵٪ بیماران هماچوری متنابض اولین تظاهر بوده درمواردی تحیرک مثانه مثل تکرار ادرار، احساس فوریت در دفع ادرار و دیزوری، خصوصاً در بیماران مبتلا به CIS دیده می‌شود. در مراحل پیشرفت‌تر بیماری، دردهای استخوانی یا درد پهلو به علت متاستاز دیده می‌شود (۱۰,۱۱).

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 وغیره 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 آنژئنیتال 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 محزن 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 بش نازکی از بلوک پارافینه که حاوی نمونه بیوپسی بود، تهیه شد. سپس پارافین اطراف نمونه توسط تیغ برداشته و پارافین باقیمانده طی مراحلی با استفاده از گزینل حذف شد و توسط الکل اتیلیک با غلظت‌های کاوش

صرف طولانی مدت داروهای مسکن و ضدسرطان، تماس با موادی مثل بنزیدین، هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک، تماس با آرسنیک (در منابع آبی)، عفونت شیستوزومایی، عفونت آنژئنیتال با (HPV) Human papiloma virus و یک سری وقایع ناشناخته کروموزومی، اشاره نمود (۱-۷).

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 آنژئنیتال HPV تیپ ۱۶ و ۱۸ با سرطان مثانه است. از آنجائی که HPV16 و HPV18 دارای انکوژن‌های شناخته شده‌ای هستند که پروتئینهای E6 و E7 را سنتز می‌نماید (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 می‌گردد. از میان تیپ‌های مختلف HPV، تیپ‌های ۱۱، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۵ و بعضی از سابتایپ‌های 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، ۴۵، ۵۹، ۶۶، ۶۸ و ۷۰)، ریسک متوسط (تیپ ۳۰، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۹، ۴۰، ۴۹، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۷، ۵۸، ۶۳ و ۶۴) و ریسک بالا (تیپ ۱۸، ۱۶ و ۴۵). تیپ‌های با ریسک بالا و متوسط به همراه سایر کوفاکتورها، مسئول بیش از ۹۰٪ موارد تومورهای آنژئنیتال بدخیم می‌باشند. HPV قادر به ایجاد کوندیلومای اکومیناتوم (یک زخم آنژئنیتال) در ناحیه تناسلی و مثانه است. این بیماری مقاربی بوده و می‌تواند ریسک فاکتوری برای تغییرات ورقه‌ای در اپیتلیوم مثانه و در نتیجه ایجاد کارسینومای مثانه باشد (۳,۷,۸). 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 موردن توجه است. از طرف دیگر تغییرات نوپلاستیک 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 نوپلاستیک 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

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

جدول ۳- توزیع فراوانی بیماران بر حسب Stage سرطان

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

بحث

سرطان مثانه دومین سرطان شایع دستگاه تناسلی- ادراری در بزرگسالان محسوب شده و در بعضی از مناطق جهان مثل افریقا، شایعترین سرطان بشمارمی آید. عوامل کارسینوژنیک و کوکارسینوژنیک متعددی در ایجاد کارسینومای مثانه دخیل می باشند 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 می‌باییم 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 کشورهایی مثل ایتالیا (۳۹/۵٪)، فنلاند (۵/۷٪) و چین (۴/۴٪) کمتر است (۱۳-۱۹). 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 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

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°C نگهداری شد.

جهت بررسی وجود HPV در نمونه‌های بیوپسی از کیت HPV Screening (ساخت کمپانی Sacace، ایتالیا) و جهت تایپینگ نمونه‌های مثبت از نظر وجود تیپ‌های پرخطر از کیت HPV Typing (ساخت کمپانی Sacace، ایتالیا) که HPV حاوی پرایمرهای اختصاصی جهت آشکارسازی ۱۴ تیپ شامل ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۵، ۳۳، ۵۶، ۵۲، ۴۵، ۳۹، ۵۸، ۵۶ و ۶۶ بود، استفاده شد. در نهایت آشکارسازی و عکسبرداری محصولات PCR زیر نور UV، پس از الکتروفوروز محصولات بمدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگار ۲٪ و ۳٪ حاوی ۰/۵-۱ 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)	شاهد		مورد	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد
۲۰- زیر	-	-	۱/۴	۲
۲۱-۳۰	-	-	۳/۴	۵
۳۱-۴۰	-	-	-	-
۴۱-۵۰	۱۵/۴	۶	۱۳/۶	۲۰
۵۱-۶۰	۳۳/۳	۱۳	۲۹/۹	۴۴
۶۱-۷۰	۲۳/۱	۹	۲۳/۱	۳۴
> ۷۰	۲۸/۲	۱۱	۲۸/۶	۴۲
جمع	۱۰۰	۳۹	۱۰۰	۱۴۷

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)، HPV31 (۶ نفر)، HPV18 (۱ نفر)، HPV33 (۱ نفر)، HPV51 (۱ نفر) و ۲ بیمار HPV16 بودند.

بیماران در این مطالعه، شامل تیپ‌های ۳۱، ۳۳ و ۵۱ بودند. این یافته‌ها موافق با یافته‌های برخی محققان پیشین است (۱۶، ۲۱، ۵۱-۶۰).

بررسی سن بیماران نشان دهنده آن بود که گروه سنی ۱۹-۶۰ سال و بیش از ۷۰ سال بیشترین تعداد افراد مبتلا به سرطان مثانه را تشکیل می‌دهند که این یافته‌ها تا حدودی 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 ۴-۳ برابر زنان اعلام نموده‌اند (۱، ۲). همچنین بیماران مرد از نظر میزان پیشرفت سرطان در Stage و Grade 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 بموضع به مراکز درمانی در صورت وجود مشکلات احتمالی و همچنین وجود برنامه‌های دقیق پیشگیری و کنترل بیماری در این کشورها در جهت کاهش ریسک عفونتها جنسی مزمن، میزان شیوع HPV ژنتیال 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 (۱۸، ۲۰).

نتایج حاصل از تایپینگ نمونه‌های HPV مثبت نشانده‌اند 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 HPV16 و HPV18 را عنوان تیپ انکوژنیک غالب HPV مرتبط با سرطان مثانه بیان نموده‌اند (۱۹، ۱۶، ۱۵، ۱۲).

REFERENCES

۱. - قاضی جهانی ب. در ترجمه: اوروپزی عمومی (اسمیت س، ریچوی د، مولفین). جاپ 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 papillumavirus 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;10:394-81.
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. Soulitzis 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.