Original Article

Frequency distribution of HPV18 based on the detection of E6 oncoprotein gene in cervix cancer samples

Mostafavizadeh SM[1], Niakan M[2], Ahmadi A[3], Aghabozorgi S[4], Lak R[5], Azimi SA[5], Piroozmand A[6*]

1- Student Research Committee, Shahed University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, I.R. Iran.
3- Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tehran University, Tehran, I.R. Iran.
4- Department of Biotechnology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Garmsar Branch, I.R. Iran.
5- Pars Hospital, Tehran, I.R. Iran.
6- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received February 25, 2013; Accepted June 2, 2013

Abstract:

Background: Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV) is one of the most important risk factors for developing cervix cancer. Since cell culture and serological methods have no diagnostic value for the detection of this virus and its variants, the importance of molecular methods such as PCR in the early and definite diagnosis of such virus becomes evident. This study aimed to evaluate the frequency of HPV18 based on detecting E6 gene in paraffin block samples using the PCR method.
Materials and Methods: In this study, 69 out of 150 cervix samples of precancerous and cancerous lesions were collected during 2007-2012. DNA was extracted from paraffin blocks using the phenol/chloroform method. Two L1 and E6 consensus primers were used to evaluate the HPV and 18 HPV, respectively.
Results: Among 69 patients with cervix cancer, 53 (76.8%) cases were HPV-positive and 16 (23.19%) HPV-negative. Twelve out of 53 (17.39%) HPV-positive cases were HPV18-positive. Moreover, 6 cases were diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia II, III and 6 with squamous cell carcinoma.
Conclusion: Results of the study confirm the previous reports concerning the relationship between HPV and cervix cancer. Considering the efficiency of DNA extraction and PCR protocol, we can use the test in pathology labs with simple and inexpensive facilities.

Keywords: E6 oncoprotein gene, Cervix cancer, HPV18 virus

* **Corresponding Author:**
Email: Apiroozmand@Kaums.ac.ir
Tel: 0098 913 262 3523
Fax: 0098 361 557 5057

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2013; Vol. 17, No 3, Pages 287-293

Please cite this article as: 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. ***Feyz*** 2013; 17(3): 287-93.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

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 [۵]، احمد پیروزمند [۶*]

خلاصه:

سابقه و هدف: آلوده شدن با انواع پر خطر 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 بلوک های پارافینه با روش فنل/کلروفرم انجام گرفت. جهت بررسی HPV عمومی و HPV-18 به‌ترتیب 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 II, III (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

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 سرطان-های سرویکس در جهان شناسایی شده‌اند [۵].

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 می-شود 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 شده ترین 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 به‌دلایل 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 به‌ترتیب 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 تقریبا ۵۴ درصد می‌باشد. احتمالا این تفاوت نشان می‌دهد که در بین زنان کشورهای اسلامی بنا به دلایل خاصی مراجعه به مراکز درمانی و تشخیص

[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 ویرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
* **نشانی نویسنده مسئول:**
کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و ویرولوژی
تلفن: ۰۹۱۳ ۲۶۲۳۵۲۳ **دورنویس:** ۰۳۶۱ ۵۵۷۵۰۵۷
پست الکترونیک: Apiroozmand@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۲/۳/۱۲

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

کمتر از سایر کشورها صورت می‌پذیرد و به‌علت نداشتن آگاهی درباره روش جلوگیری از بیماری‌های منتقله جنسی و عدم انجام منظم تست‌های غربال‌گری خطر عفونت پایدار HPV به‌طور وسیعی افزایش یافته است [۱۲]. میزان فراوانی و گستردگی ویروس بستگی به مناطق جغرافیایی نیز دارد و حتی از افراد به‌ظاهر 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 ژنوتیپ‌های۳۵ و ۵۸ غالب می‌باشند و HPV58 بیشتر در منطقه اقیانوس آرام شیوع دارد [۱۴،۱۳]. تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های HPV به‌دلیل 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؛ به‌طوری که به تشخیص قطعی بیماری کمک بسیار می‌کند. بر اساس مطالعات انجام شده به‌وسیله 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 بی ثباتی ژنومی می‌شوند [۱۷،۱۶]. 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 به‌دلیل 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 MY09/MY11 و GP5+/GP6+ توصیف شده‌اند که با آنها می‌توان طیف وسیعی از HPV ها و نه انواع پر خطر را نشان داد [۲۰،۱۹]. از طرف دیگر مطالعات زیادی در مورد بررسی انواع پر 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 به‌کار بردیم که می‌تواند ناحیه E6 از HPV18 را به‌صورت اختصاصی در بلوک‌های پارافینی تشخیص دهد.

مواد و روش‌ها

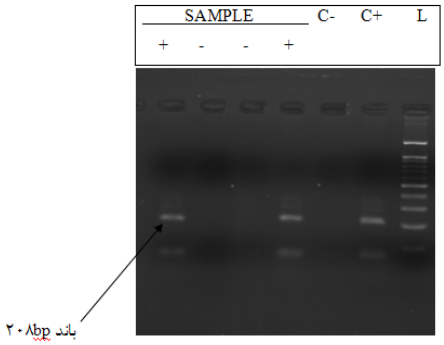
۶۹ نمونه بلوک پارافینی مربوط به سرطان دهانه رحم پس از مطالعه پرونده‌های حجم نمونه بیمارستانی و پرونده‌های بخش پاتولوژی بیمارستان‌های پارس، میرزا کوچک خان و امام خمینی تهران و مرور لام‌های مربوطه انتخاب شدند. از بلوک‌های فوق یک برش ٤ میکرونی تهیه شده و روی لام فیکس شد. این برش‌ها به‌روش هماتوکسیلین و 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. به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه در داخل دستگاه Hot block گذاشته و با دور ۱٤۰۰۰ به‌مدت 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 به‌مدت 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. متعاقبا به آن ۳۰۰µl از بافر هضم ([50Mm Tris-HCL [pH 7.5، 10mM EDTA، 0.5% Sodium dodeyl sulfate، 50 mM NaCL و 1.5 mg/ml Proteinase K) محصول شرکت Merck اضافه شده و در دمای ۵٦ درجه به‌مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد تا پروتئین‌هایی که در موجود است، هضم شوند. بعد از سانتریفیوژ کردن، ماده رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. برای به‌دست 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 پر خطرآن، HPV-18، مشخص گردیدند. از آنجا که بیان انکوژن‌های E6 و E7 انواع ۱٦ 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 [۲۳،۲۲].

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

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]	٤٥٠bp	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)

مطابق پروتکل زیر همه‌ی نمونه‌ها به روش PCR بررسی شدند: مخلوط واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه گردید که حاوی 35µl H_2O، 6µl 10 X Buffer، 2µl $MgCl_2$، 0.5µl dNTP، 0.5µl Primer F، 0.5µl Primer R، 0.5µl Taq و 5 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 به‌دست آمده در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با استفاده از رنگ‌آمیزی 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.**



شکل شماره ۱- باند ۲۰۸bp مربوط به ژن HPV18 E6 .
L: Ladder, C+: Positive Control, C-: Negative control
L : راهنما، C+: کنترل مثبت، C-:کنترل منفی

جدول شماره ۲- شرایط انجام PCR

مرحله	حرارت	زمان	تعداد چرخه
بازشدن اولیه	۹۵ ^{0}C	۵ دقیقه	۱
بازشدن	۹۵ ^{0}C	۳۰ ثانیه	٤٠ چرخه
اتصال پرایمر	۵۵ ^{0}C	٤٥ ثانیه	
طویل سازی	۷۲ ^{0}C	۱ دقیقه	
طویل سازی نهایی	۷۲ ^{0}C	۵ دقیقه	۱

نتایج

با استفاده از پرایمرهای مخصوص عموم HPV ها، ۵۳ مورد (۷٦/۸۱ درصد) از ٦۹ نمونه مثبت شدند. از این تعداد ۱۷ مورد (٦۵/۳۹ درصد) در مراحل ۲ و ۳ نئوپلازی داخل اپی‌تلیال سرویکال (CIN II و CIN III) و ۳٦ مورد دارای سرطان بودند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HPV18 E6، ۱۲ مورد (۱۷/۳۹ درصد) از ٦۹ بلوک پارافینه، مثبت (محصولات PCR با طول باند ۲۰۸bp) بودند. از این ۱۲ بیمار ٦ مورد CIN II و CIN III و ٦ مورد SCC (اسکوآموس‌سل کارسینوما) داشتند (جدول شماره ۳).

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

		HPV		HPV18		جمع
		مثبت	منفی	مثبت	منفی	
تشخیص پاتولوژی	CIN	۱۷(٪٦٥/۳۹)	۹(٪۳٤/٦۱)	٦(٪۲۳/۰۸)	۲۰(٪۷٦/۹۲)	۲٦(٪۱۰۰)
	SCC	۳٦(٪۸۳/۷۲)	۷(٪۱٦/۲۸)	٦(٪۱۳/۹۵)	۳۷(٪۸٦/۰۵)	٤۳(٪۱۰۰)
جمع		۵۳ (٪۷٦/۸۱)	۱٦ (٪۲۳/۱۹)	۱۲(٪۱۷/۳۹)	۵۷(٪۸۲/٦۱)	٦۹(٪۱۰۰)

هم‌چنین، یافته‌های این مطالعه (جدول شماره ٤) نشان داد که بیشتر بیماران مبتلا به SCC و CIN در طیف سنی ۵۹-٤۰ قرار داشتند که معادل ۵۷/۹۷ درصد می‌باشد. سوابق OCP، مصرف دخانیات و زایمان از ٤٤ بیمار در دسترس بود که بنا بر ابتلای به CIN وSCC در تمام بیماران به‌ترتیب زیر گزارش گردید: ۵۲/۲۷ درصد از بیماران از قرص استفاده می‌کردند، ۳۱/۸۱ درصد مصرف دخانیات داشتند و ٤۳/۱۸ درصد از بیماران بیش از ٤ بار زایمان داشتند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

جدول شماره ٤- 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	١٤	۰/۰١٦
	٤۰-۵۹	(٪۸۰)۳۲	(٪۲۰)۸	٤۰	
	٦۰ و بیشتر	(٪۹۳/٦)١٤	(٪٦/۷)١	١۵	
سن ازدواج	۱۷ و کمتر	(٪١٤/۳)٤	(٪۸۵/۷)٢٤	۲۸	۰/٤۳٤
	بیشتر از ۱۸	(٪۲۵)٤	(٪۷۵)١٢	١٦	
مصرف دخانیات	دارد	(٪۰)۰	(٪١۰۰)۷	۷	۰/۵٤۵
	ندارد	(٪١۳/۳)۲	(٪۸٦/۷)١۳	١۵	
مصرف قرص ضد بارداری	دارد	(٪۲۰/۷)٦	(٪۷۹/۳)۲۳	۲۹	۰/٦۹۵
	ندارد	(٪١۳/۳)۲	(٪۸٦/۷)١۳	١۵	
تعداد زایمان	۳ و کمتر	(٪١۹)٤	(٪۸١)١۷	۲۱	n.s
	بیشتر از ٤	(٪١۷/٤)٤	(٪۸۲/٦)١۹	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 ژنE6 می‌باشد. به‌دلیل اینکه غربال‌گری سیتولوژیک به تنهایی برای تشخیص روند سرطان‌زایی کفایت نمی‌کند و اینکه مطالعات ثابت کرده‌اند آنهایی که سرطان داشته‌اند حتما HPV نیز در آنها وجود دارد با مشخص شدن تیپ-های پرخطر ویروس پاپیلوماویروس انسانی که عامل اصلی سرطان سرویکس بوده و تعیین به موقع و درمان سریع این نوع عفونت‌ها، می‌توان از پیشرفت ضایعات ایجاد شده و سرطانی شدن ممانعت نمود. هم‌چنین، می‌توان به اهمیت و ضرورت جایگاه تشخیص حضور ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی و میزان بیان تظاهر پروتئین E6 در برنامه‌های غربال‌گری در جامعه و اقدامات معمول بالینی پی برد. در مطالعه حاضر از مجموع ٦۹ نمونه در ۵۳ مورد از آنها ویروس یافت شد که معادل ۷٦/۸ 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،۲٤]. البته مطالعاتی در این زمینه توسط محققین کشورمان به‌صورت منطقه‌ای انجام شده است. به‌عنوان مثال همکار و همکارانش [۲٦] در مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۲ بر روی ۱۰۰ نمونه بیوپسی در منطقه مازندران نشان دادند که انواع ژنوتیپ ١٦ و ۱۸ در ٦۰/٦ 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 ۲٦/۷ 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 به‌طور تصادفی بیماران مربوط به اقصی نقاط ایران وارد مطالعه گردند. در مطالعه‌ی غفاری که بر روی ١٣٤ نمونه ترشحات زنان نرمال و غیر نرمال در سال بر روی ١٣٤ نفر انجام شد، ژنوتیپ ۱۸ در ۲۸ درصد افرادی که تومور داشتند و ۸ درصد در کل نمونه-های غیر نرمال وجود داشت به‌نظر می‌رسد تفاوت آماری به نوع نمونه و درجه وخامت آن مربوط باشد [۲۸]. در دو مطالعه‌ای که توسط نیاکان و همکاران در سال ١٣٨٦ و ١٣٨٩ بر روی نمونه‌های بافتی سرطان سرویکس [۳۰،۲۹] انجام شده است به‌ترتیب حضور پاپیلومای انکوژنیک را ۲٤/۷ درصد و ٦۵ درصد گزارش نموده‌اند که مطالعه اول شاید به‌دلیل 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 ٦٦ نمونه ترشحات انجام شد، ژنوتیپ ۱۸ و ١٦ به‌ترتیب ٤٦-٦۳ درصد و ۱۰-١٤ درصد گزارش گردید [۳۱]. این آمار در مطالعه‌ای که در کشور آلمان توسط Varnai و همکاران در سال ۲۰۰٦ بر روی ۵۸ نمونه بافتی انجام شده است به‌ترتیب ٤/۵ و ٦٦/٦٦ درصد گزارش گردید که به‌نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به‌خاطر تفاوت جغرافیایی است. شاید یکی دیگر از تفاوت‌ها به‌دلیل 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 به‌ذکر است که آلودگی به ویروس پاپیلومای 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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

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 به‌نظر 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 ٦٠-٦٤ سال است [۳۵،۳٤]. بررسی ما نشان داد گروه سنی ۵۹-٤٠ سال بیشترین درصد بیماران آلوده به HPV و HPV18 را تشکیل می‌دادند و این مشابه نتایج به‌دست آمده توسط Ramdas Chatterjee و همکاران در هند است که ٤٨/۳۵ سال می‌باشد، ولی بر خلاف نتایج آنها همه بیماران منفی از نظر HPV نیز در همین گروه سنی قرار دارند [۳٦]. 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 به‌دست آمده از DNA استخراج شده از برش بلوک‌های پارافینی برای آزمایش PCR کافی می‌باشد و با توجه به کارایی این پروتکل می‌توان به‌صورت معمول این تست را در آزمایشگاه پاتولوژی با استفاده از امکانات ساده و ارزان انجام داد. نظر به این که در سرطان دهانه رحم به‌علت 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 به‌عفونت 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 به‌علاوه با این تکنیک می‌توان انواع مختلف ویروس HPV را در افراد بیمار و حتی به‌ظاهر سالم نیز شناسایی نموده و بهره گرفتن از این سیستم می‌تواند به مطالعات اپیدمیولوژی ویروس HPV در جامعه کمک بزرگی بنماید.

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.

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, Forslundo J, Johansons 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. Knowdlege and preventive behaviors related to cervical cancer and human papiloma virus in a group of Chilean adolescents. ***Rev Chilena Infectol*** 2012; 29(6): 600-6.
[10] Cox JT. Human papiloma virus testing in primary cervical screening and abnormal papaniculaou 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]

[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 humanpapillomaviruses 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, Eftekhar 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 papiloma virus infection: an old disease, a new vaccine. ***J Aust N Z Obstet Gynecol*** 2006; 46(3): 180-5.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-01-02]