نقش عفونت ویروس پاپیلوم انسانی در کارسینوم پروستات

رسول همکار[۱]، محمود پروین[۲] ، نسترن قوامی[۳] ، آمیتیس رمضانی[۴]، مهسا نادری[۳] ، محمد بنی فضل[۵] ، آتسا پاک فطرت[۶] ،علی اسلامی فر[۷] و آرزو آقاخانی*[۷]

۱. PhD ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. متخصص پاتولوژی ، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. دانشجوی فوق لیسانس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
۴. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران
۵. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۶. متخصص پاتولوژی،استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۷. متخصص پاتولوژی ، استادیار انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،گروه تحقیقات بالینی، تلفن:۶۶۴۶۵۱۴۷ نمابر۶۶۴۶۵۱۴۷ ،
aaghakhani@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: بهمن هشتاد هشت پذیرش برای چاپ: فروردین هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت ویروس پاپیلوم انسانی(HPV) با ضایعات خوش خیم و بدخیم ناحیه تناسلی زنان و انوژنیتال مردان مرتبط می باشد. یافته ها در مورد نقش این ویروس در ایجاد کانسر پروستات متناقض می باشد. هدف از این مطالعه تعیین نقشHPV در ایجاد کارسینوم پروستات(PCa) می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه بلوک های پارافینی۱۰۴ بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم اولیه پروستات و ۱۰۴ فرد مبتلابه هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH) به عنوان گروه کنترل ، از نظر حضور HPVبررسی شدند. HPV-DNA تخلیص و با استفاده از روش nested PCR تکثیر شد. سپس تیپ های مختلف HPV توسط سکوانسینگ تعیین گردید.*

یافته ها: *HPV-DNA در ۱۳ مورد از ۱۰۴ مورد PCa (۱۲/۵٪) و ۸ مورد از ۱۰۴ مورد BPH (۷/۷٪) یافت شد. اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر حضور HPV-DNA در نمونه های پروستات وجود نداشت. پاپیلوما ویروس های پرخطر در۱۰ مورد از ۱۳ (۷۶/۹٪) نمونه PCa و ۵ مورد از ۸(۲۳/۱٪) نمونه BPH دارای HPV-DNA یافت شد. ویروس های با خطر پایین در۳ مورد از ۱۳ (۲۳/۱٪) نمونه PCa و ۳ مورد از ۸(۳۷/۵٪) نمونه BPH دارای HPV-DNA یافت شد. اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر نوع پاپیلوما ویروس ها دیده نشد.*

نتیجه گیری: *یافته های ما نقش HPV در ایجاد کانسر پروستات را تایید نمی نماید. مطالعات بیشتر در خصوص نقش HPV در کارسینوژنز پروستات لازم می باشد.*

واژگان کلیدی: ***ویروس پاپیلوم انسانی(HPV) ، کارسینوم پروستات(PCa)، هایپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH)***

مقدمه

کارسینوم پروستات(PCa) پس از کانسر ریه شایعترین بدخیمی در مردان بوده و دومین علت مرگ به دلیل بدخیمی را تشکیل می دهد. عوامل خطر متعددی از جمله سن ، نژاد ، سابقه فامیلی ، سطوح هورمونی و عوامل محیطی در ایجاد این بدخیمی نقش دارند(۱). در مطالعه ای که توسط Babaei و همکاران در ایران صورت گرفته این بدخیمی پس از کانسر معده دومین بدخیمی شایع در مردان می باشد(۲). Hosseini و همکاران گزارش کردند که شیوع کانسر پروستات در ایران ۳/۴۳٪ می باشد (۳). در مطالعه ای که توسط Sadjadi و همکاران انجام شده میزان بروز این بدخیمی در ایران ۵/۱ در صدهزار نفر در سال گزارش شده است(۴).

شناسایی نقش عوامل عفونی در ایجاد PCa حائز اهمیت است. پروستات به دلیل موقعیت آناتومیک و دسترسی مستقیم ویروس پاپیلوم انسانی(HPV) به آن از طریق اورترا بافت هدف برای عفونت این ویروس می باشد(۵). HPV با ایجاد کانسرهای انوژنیتال مانند کانسر سرویکس ، آنال و واژینال مرتبط بوده و یک عفونت منتقله از راه جنسی محسوب می شود(۵). هر دو HPV ۱۶ و ۱۸ با ایجاد این کانسرها مرتبط می باشند. HPV-16 تقریبا مسئول ۵۰٪ این بدخیمی ها می باشد. فراوانی HPV-18 از نظر جغرافیایی بسیار متغیر بوده و قوی ترین ارتباط را با آدنو کارسینوم سرویکس دارد(۶). ارتباط عفونت HPV به عنوان یک عفونت منتقله از راه جنسی با PCa از طریق ایجاد التهاب مزمن و ضایعات اکسیداتیو ژنومیک در اپی تلیوم پروستات توجیه می شود(۷).در سال ۱۹۹۰ McNicol و Dodd گزارش کردند که HPV ۱۶ و ۱۸در بافت پروستات نرمال و بدخیم یافت می شود(۸ و ۹). از این سال به بعد مطالعات متعددی در بافت کارسینوم پروستات توسط روشهای PCR در مورد نقش HPV انجام شد (۲۲-۱۰). ولی هنوز هیچ نوع شواهد قطعی در مورد نقش این ویروس در ایجاد کارسینوم پروستات وجود ندارد. در حقیقت عفونت HPV و ارتباط آن با کارسینوم پروستات هنوز به خوبی روشن نیست(۲۳).از آنجا که یافته ها در مورد نقش این ویروس در ایجاد کانسر پروستات متناقض می باشد، برآن شدیم که در این مطالعه نقش HPVدرایجاد کارسینوم پروستات(PCa) را بررسی نماییم.

روش کار

بلوک های پارافینی ۱۰۴ بیمار مبتلا به کانسر پروستات و ۱۰۴ بیمار دارای هایپرپلازی خوش خیم پروستات که به مراکز رفرال اورولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه نموده و دارای تشخیص کانسر پروستات و یا هایپرپلازی خوش خیم پروستات بودند، از مراکز درمانی مربوطه جمع آوری گردید. سپس بلوک ها برش داده شده ولام های تهیه شده برای تایید تشخیص و تعیین بهترین بلوک از نظر وضوح و عدم وجود نکروز، توسط پاتولوژیست بررسی گردید. بلوک های انتخاب شده جهت انجام PCR آماده شده و برش های ۵ تا ۱۰ میکرومتر از آنها جهت استخراج DNA تهیه شد. این برش ها توسط گزیلول دپارافینه شده و توسط بافر حاوی پروتئیناز K هضم شدند. سپس DNA توسط روش فنل / کلروفرم استخراج گردید.کیفیت DNA توسط PCR با استفاده از پرایمرهای PCO3/PCO4 که یک قطعه ۱۱۰-bp از محصول ژن بتا گلوبین انسانی را تکثیر می نمایند مورد ارزیابی قرار گرفت.

پرایمرهای ژن ß Globin به قرار زیر بودند. با این روش مشاهده شد که استخراج بصورت مطلوبی انجام گرفته و نمونه ها برای PCR مناسب می باشند.

PCO3 : 5´- ACACAACTGTGTTCACTAGC-3´
PCO4 : 5´- CAACTTCATCCACGTTCACC-3´

سپس نمونه های بتا گلوبین مثبت از نظر حضور HPV توسط Nested PCR با استفاده از پرایمرهای خارجی(MY09/MY11) و پرایمرهای داخلی(GP5+/GP6+)که برای HPV L1 open reading frame (ORF)طراحی شده اند،مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای خارجی سنتز یک قطعه bp - ۴۵۰ و پرایمرهای داخلی یک قطعهbp - ۱۵۰ را کاتالیز می کنند.توالی نوکلئوتیدی جفت پرایمر MY09/11 عبارت بود از :

MY09: 5’ - CGTCC (A/C) A (A/G) (A/G) GGA (A/T) ACTGATC - 3’
MY11: 5’ - GC (A/C) CAGGG (A/T) CTATAA(C/T) AATGG - 3’

محصول این PCR بعنوان الگوی DNA در PCR بعدی (با پرایمرهای GP5+/GP6+) مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرهای عمومی GP5+/GP6+ عبارت بودند از:

GP5+: 5´- TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3´
GP6+:5´-AAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3´

فرآورده PCR این پرایمرها قطعه ای به طول bp ۱۵۰ می باشد.

محصولات PCR تحت الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ قرار گرفته و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.یافته ها با استفاده از نرم افزارSPSS۱۶ و آزمونهای آماری t و chi-square (یا تست دقیق فیشر) تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی $P < ۰/۵۰$ قرار داده شد. داده ها به صورتmeans ± standard deviations و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند.

یافته ها

بلوک های پارافینی ۱۰۴ بیمار مبتلا به کانسر پروستات (PCa) با سن متوسط ۷/۴۰ ±۶۲/۷۷ سال (طیف ۴۶-۸۵ سال) و ۱۰۴ بیمار دارای هایپرپلازی خوش خیم پروستات(BPH) با سن متوسط۷/۶۹ ±۶۹/۴۵ سال (طیف ۴۷-۸۶ سال) مورد بررسی قرار گرفتند.متوسط Gleason score موارد کانسر پروستات۱/۱۳±۷/۱۳ (طیف ۵-۹) بود. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) در ۲۹ بیمار از ۱۰۴ بیمار (۲۷/۹٪) و low grade PIN در ۲ بیمار از ۱۰۴ بیمار (۱/۹٪) مبتلا به PCa مشاهده گردید.HPV-DNA در ۱۳ مورد از ۱۰۴ مورد PCa (۱۲/۵٪) و ۸ مورد از ۱۰۴ مورد BPH (۷/۷٪) یافت شد. اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر حضور HPV-DNA در نمونه های پروستات وجود نداشت.پاپیلوویروس های پر خطر (High risk) در۱۰ مورد از ۱۳ (۷۶/۹٪) نمونه PCa و ۵ مورد از ۸(۲۳/۱٪) نمونه BPH دارای HPV-DNA یافت شد. ویروس های با خطر پایین (Low risk) در۳ مورد از ۱۳ (۲۳/۱٪) نمونه PCa و ۳ مورد از ۸(۳۷/۵٪) نمونه BPH دارای HPV-DNA یافت شد. به عبارت دیگر ویروس پرخطر در۱۰ مورد از ۱۰۴ (۹/۶٪) نمونه PCa و ۵ مورد از ۱۰۴ (۴/۸٪) نمونه BPH یافت شد. ویروس با خطر پایین در۳ مورد از ۱۰۴ (۲/۹٪) نمونه PCaو نیزBPH یافت شد. اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر حضور ویروس های پرخطر و کم خطر وجود نداشت. HPV-16 در نمونه های PCaو BPH تیپ غالب بود.

بحث

این مطالعه به بررسی نقش HPV در PCa می پردازد. در این مطالعه اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر حضور HPV-DNA در نمونه های پروستات وجود نداشت.

HPV درپاتوژنز ۱۵٪ بدخیمی های انسانی دخیل می باشد (۲۴). این ویروس عامل ایجاد چندین کارسینوم انوژنیتال از جمله کانسر سرویکس ، آنال ، penis و واژن می باشد. اصلی ترین تیپ های HPV دخیل در این بدخیمی ها HPV-16 و HPV-18 بوده و در مطالعات مختلف HPV-16 مسئول تقریبا ۵۰٪ بدخیمی های ناشی از HPV می باشد(۲۵). یافته ها در مورد نقش این ویروس در ایجاد کانسر پروستات متناقض است (۲۸-۲۶). در برخی مطالعات این میزان صفر و در سایر مطالعات ۲-۱۰۰٪گزارش شده است (۲۲-۱۰).

در مطالعه ای که توسط Rosenblott و همکاران انجام شدارتباطی بین حضور HPV و کانسر پروستات مشاهده نشد(۲۷). مطالعات Sfanos ،Kong و Bergh نیز ارتباطی بین HPV و کانسر پروستات را نشان ندادند (۳۰-۲۸). در مطالعه ای که توسط Kuczyk و همکاران انجام شد HPV، در ۲۱٪ نمونه های بدخیم پروستات و ۳٪ موارد BPH یافت شد (۲۲). در مطالعه دیگری در ۶۵/۳٪ بیوپسی های بدخیم پروستات و ۴۸٪ بیوپسی های خوش خیم آن HPV-DNA یافت شد که تیپ های پرخطرHPV در ۵۳/۸٪ موارد کانسر و ۲۰٪ موارد خوش خیم مشاهده شدند(۱۷). Leiros و همکارانش در ۴۱/۵٪ نمونه های کارسینوم پروستات HPV-DNA را گزارش نمودند در حالیکه در مطالعه آنها نمونه های BPH فاقد HPV بودند (۱۸).McNicol وهمکاران گزارش کردند که HPV-16 در ۳۴ مورد از ۵۶ مورد BPH و ۱۴ مورد از ۲۷ مورد کارسینوم پروستات وجود داشته است. HPV-18 در ۳ مورد BPH و یک مورد کارسینوم گزارش گردید (۹).

در مطالعه ما اختلاف معنی داری بین افراد مبتلا به PCa و BPH از نظر حضور HPV-DNA در نمونه های پروستات وجود نداشت. لذا این مطالعه نقش HPV در ایجاد کانسر پروستات را تایید نمی نماید. نتایج این مطالعه مشابه نتایج مطالعات Rosenblott ، Sfanos ،Kong و Bergh می باشد (۳۰-۲۷) که در آنها نیز ارتباطی بین حضور HPV و کانسر پروستات مشاهده نشد.

در این مطالعه ویروس های پرخطر پاپیلوما در ۹/۶٪ نمونه های PCa و ۴/۸٪ نمونه های BPH یافت شد. شیوع بسیار متفاوت اینگونه ویروس از ۲ تا ۵۳٪ در نمونه های PCa و BPH گزارش شده است (۲۲). این اختلافات به روشهای تشخیصی و نحوه نمونه گیری مرتبط می باشد. در مطالعه ما از ۱۳ مورد PCa دارای HPV-DNA ، ۱۰ نمونه حاوی HPV های high risk بود و حضور این HPV های پر خطر می تواند ایجاد بخشی از کانسرهای پروستات را توجیه کند. یافتن پاپیلوما ویروس های پرخطر در نمونه های پروستات غیر بدخیم و بالعکس تعجب آور نیست زیرا این ویروس از راه جنسی منتقل شده و می تواند در بافتهای نرمال و بدخیم پروستات یافت شود(۹).

نتیجه گیری

یافته های ما نقش HPV در ایجاد کانسر پروستات را تایید نمی نماید. مطالعات بیشتر در خصوص نقش HPV در کارسینوژنز پروستات لازم می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از انستیتوپاستور ایران برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر می نمایند.

REFERENCES

1. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. Sixth ed. Philadelphia, U.S.A:W.B Sanders; 1999, p1029-1031.

2. Babaei M, Mousavi S, Toussy J. Cancer occurrence in old age: Results of a population-based cancer registry in Semnan, Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2006; 7(2):191-4.

3. Hosseini SY, Moharramzadeh M, Ghadian AR, Hooshyar H, Lashay AR, Safarinejad MR. Population-based screening for prostate cancer by measuring total serum prostate-specific antigen in Iran. Int J Urol. 2007; 14(5):406-11.

4. Sadjadi A, Nooraie M, Ghorbani A, Alimohammadian M, Zahedi MJ, Darvish-Moghadam S, et al. The incidence of prostate cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. Arch Iran Med. 2007; 10(4):481-5.

5. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses, 64: IARC Lyon, France 1995.

6. Bosch FX, Manos MM, Munoz 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. J Natl Cancer Inst. (Bethesda) 1995; 87: 779-780.

7. Nelson WG, DeMarzo AM, DeWeese TL. The molecular pathogenesis of prostate cancer: focus on the earliest steps. Eur Urol 2001; 39 Suppl 4:8–11.

8. McNicol PJ, Dodd JG. Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay. J Clin Microbiol 1990; 28(3): 409–412.

9. McNicol PJ, Dodd JG. Detection of papillomavirus DNA in human prostatic tissue by Southern blot analysis. Can J Microbiol 1990; 36 (5): 359–362.

10. Anwar K, Nakakuki K, Shiraishi T, Naiki H, Yatani R, Inuzuka M. Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas. Cancer Res1992; 52 (21): 5991–5996.

11. Sarkar FH, Sakr WA, Li YW, Sreepathi P, Crissman JD. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in human prostatic tissues by polymerase chain reaction (PCR). Prostate 1993; 22 (2): 171–180.

12. Dodd JG, Paraskevas M, McNicol PJ. Detection of human papillomavirus 16 transcription in human prostate tissue. J Urol 1993; 149 (2): 400–402.

13. Moyret-Lalle C, Marçais C, Jacquemier J, Moles JP, Daver A, Soret JY, et al. ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. Int J Cancer 1995; 64 (2): 124–129.

14. Suzuki H, Komiya A, Aida S, Ito H, Yatani R, Shimazaki J. Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. Prostate 1996; 28(5):318-24.

15. Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. Urol Res 1998; 26(3):165-9.

16. Adami HO, Kuper H, Andersson SO, Bergström R, Dillner J. Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: a population-based case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12 (9): 872–875.

17. Carozzi F, Lombardi FC, Zendron P, Confortini M, Sani C, Bisanzi S, et al. Association of human papillomavirus with prostate cancer: analysis of a consecutive series of prostate biopsies. Int J Biol Markers 2004; 19(4):257-61.

18. Leiros GJ, Galliano SR, Sember ME, Kahn T, Schwarz E , Eiguchi K. Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. BMC Urol 2005; 5: 15–21.

19. Balis V, Sourvinos G, Soulitzis N, Giannikaki E, Sofras F, Spandidos DA. Prevalence of BK virus and human papillomavirus in human prostate cancer. Int J Biol Markers 2007; 22 (4): 245–251.

20. Sutcliffe S, Giovannucci E, Gaydos CA, Viscidi RP, Jenkins FJ, Zenilman JM ,et al. Plasma antibodies against Chlamydia trachomatis, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: a prospective study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16 (8):1573–1580.

21. Al Moustafa AE. Involvement of human papillomavirus infections in prostate cancer progression. Med Hypotheses 2008; 71(2):209-11.

22. Kuczyk M, Serth J, Machtens S, Jonas U. Detection of viral HPV 16 DNA in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia by quantitative PCR-directed analysis. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2000; 3(S1):S23.

23. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses, 64: IARC Lyon, France 1995.

24. Moyret-Lalle C, Marcais C, Jacquemier J, Moles JP, Daver A, Soret JY, et al. Ras, p53 and HPV status in benign and malignant prostate tumors. Int J Cancer. 1995; 64:124–129.

25. Cuzick J. Human papillomavirus infection of the prostate. Cancer Surv. 1995; 23:91–95.

26. Dillner J, Knekt P, Boman J, Lehtinen M, Geijersstam V, Sapp M, et al. Sero-epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. Int. J. Cancer1998; 75: 564-567.

27. Rosenblatt KA, Carter JJ, Iwasaki LM, Galloway DA, Stanford JL. Serologic evidence of human papillomavirus 16 and 18 infections and risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003; 12(8):763-8.

28. Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, Dick JD, De Marzo AM, Isaacs WB. A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms. Prostate 2008; 68:306–320.

29. Kong DB, Zheng XY, Xie LP, Sima N. Is prostate cancer an HPV-associated lesion? Med Hypotheses 2009; 72(1):101.

30. Bergh J, Marklund I, Gustavsson C, Wiklund F, Gronberg H, Allard A, et al. No link between viral findings in the prostate and subsequent cancer development. Br J Cancer 2007;96 :137–139