

ارتباط عفونت پاپیلوما ویروس انسانی با کارسینوم سلول سنگفرشی مری

سیدامید عمادیان ساروی (MD)^۱، فرشاد نقشوار (MD)^۱، علیرضا رفیعی (PhD)^۲، ایرج ملکی (MD)^{۳*}، ژیلا ترابی زاده (MD)^۱

محمد رضایی فر (MD)^۱

۱- گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳- گروه داخلی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دریافت: ۸۹/۹/۱۳، اصلاح: ۸۹/۱۱/۲۰، پذیرش: ۹۰/۲/۷

خلاصه

سابقه و هدف: پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) در ایجاد سرطان قسمتهای مختلف بدن نظیر سرویکس و حفره دهان نقش کلیدی بازی می کند. اپی تلیوم سنگفرشی مری بافت مستعدی برای عفونت با HPV است. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط عفونت پاپیلوما ویروس با کارسینوم سلول سنگفرشی مری انجام شد. **مواد و روشها:** این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۴۰ نمونه سرطان مری و ۴۰ نمونه بافت غیر سرطانی از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی ساری در طی سالهای ۸۷-۱۳۸۰ انجام شد. پس از استخراج DNA نمونه ها، وجود و ژنوتیپ HPV به کمک پرایمرهای اختصاصی به روش PCR بررسی شد. **یافته ها:** از ۴۰ نمونه بافتی سرطان سلول سنگفرشی مری (SCC) ۱۵ نمونه (۳۷/۵٪) حاوی HPV-DNA بودند، در حالیکه تنها ۵ نمونه (۱۲/۵٪) از نمونه های بافتی گروه شاهد از نظر HPV مثبت بود (p=۰/۰۳). شایعترین ژنوتیپهای HPV در گروه بیماران مبتلا به ESCC شامل HPV_{۱۶} و HPV_{۴۵}، هریک ۶ نمونه (۱۵٪) و در گروه شاهد HPV_{۱۶} ۳ نمونه (۷/۵٪) و HPV_{۴۵} ۲ نمونه (۵٪) بود. وجود همزمان HPV_{۱۶} و HPV_{۴۵} فقط در سه نمونه از بافتهای مربوط به سرطان سنگفرشی مری مثبت بود. ارتباطی بین ژنوتیپ HPV، سن، جنس، stage و grade تومور سلول سنگفرشی مری وجود نداشت. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که ممکن است پاپیلوما ویروس انسانی یک عامل خطر ساز برای بروز سرطان مری بشمار آید.

واژه های کلیدی: سرطان سلول سنگفرشی مری، پاپیلوما ویروس انسانی، بی سی آر.

مقدمه

۱۰۰ در ۱۰۰۰۰۰ و میزان مرگ و میر آن ۲۰٪ است. از کشورهای با بروز بالا می توان از پورتوریکو، ایران، آفریقای جنوبی و روسیه نام برد. در ایالات متحده میزان بروز ۸-۲ نفر در ۱۰۰۰۰۰ نفر بوده و در سیاهان بیشتر از سفید پوستان است (۱). کشور ایران نیز منطقه پر خطر از نظر کانسر مری محسوب می شود، بطوریکه در مناطق شمالی ایران، میزان بروز کارسینوم سنگفرشی مری بالای ۱۰۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است. عوامل خطر ساز شناخته شده این بدخیمی سیگار، الکل، تنباکو، تنگی ناشی از مواد سوزاننده، آسلازی، سندرم

تومورهای بدخیم مری، یکی از سرطانهای مهم و شایع می باشند و تا مراحل پیشرفته بیماری بدون علامت می مانند. شناسایی و درمان زودرس آنها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این بین کارسینوم سلول سنگفرشی مری (Esophageal Squamous Cell Carcinoma, ESCC) از شیوع بالاتری برخوردار است. کارسینوم سلول سنگفرشی بیشتر در مردان بالای ۵۰ سال دیده می شود. این تومور در بعضی از کشورهای جهان و در بعضی از مناطق این کشورها شایع تر است، برای مثال در منطقه شمال و شرق چین بروز این تومور

این مقاله حاصل پایان نامه دکتر محمد رضایی فر دستیار پاتولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۵۷-۸۸ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد. * مسئول مقاله:

e-mail: iradj2001@yahoo.com

آدرس: ساری، بیمارستان امام خمینی، بخش داخلی، تلفن: ۰۱۵۱-۲۲۶۱۷۰۱-۴

اوتونوفلیک بودند. بیماران با سابقه ازوفاژیت اثبات شده در آسیب شناسی، سابقه آندوکارسینوم معده یا گاسترکتومی، سابقه کانسر اوروفارنکس و لارنکس وارد مطالعه نشدند.

ابتدا بر اساس اطلاعات موجود در پرونده و در برخی موارد با تماس با خانواده بیماران اطلاعات ضروری شامل جنس، سن، نوع بیماری، سطح بندی انتشار (Stage) و درجه بندی میکروسکوپی (Grade) تومور مجدداً مورد ارزیابی قرار گرفت و اطلاعات بدست آمده در فرم هایی که بدین منظور تهیه شده بود، ثبت شد. از بلوکهای پارافینی، برشهای ۵ میکرومتری تهیه گردید، این برشها در لوله های مخصوص نگهداری شدند و برای غربالگری آلودگی با HPV و همچنین تعیین ژنوتیپهای ویروس HPV در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی و تعیین ژنوتیپ ویروس HPV: به منظور استخراج

DNA، ابتدا برشهای ۵ میکرومتری تهیه شده از بلوکهای پارافینی افراد تحت مطالعه، با استفاده از گزبلول و تحت گردانان الکل اتانل پارافین گیری انجام شد، سپس DNA نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (ساخت شرکت Amplisense روسیه) براساس دستورالعمل شرکتی سازنده استخراج گردید. مقدار و خلوص DNA استخراج شده با اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکترومتر UV تعیین شد. بطوریکه خلوص DNA برابر ۲-۱/۸ و میزان آن حدود ۸۰-۶۰ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. برای شناسایی حضور DNA ویروس HPV در نمونه ها و تعیین ژنوتیپ ویروس با استفاده از کیتهای شناسایی و ژنوتیپینگ HPV HCR Eph - (ساخت شرکت Amplisense روسیه) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. این کیت براساس روش Nested-PCR و همینطور روش RFLP قادر به شناسایی تیپهای ۱۶، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۹، ۵۲، ۵۶، ۵۸ و ۶۶ در نمونه های بالینی می باشد. روش مورد استفاده در کیت تعیین ژنوتیپ، تکثیر همزمان قطعات DNA چهار تیپ ویروس HPV می باشد که در نهایت قطعات تکثیر یافته طولهای متفاوتی خواهند داشت. برای بررسی صحت انجام PCR از کنترل مثبت داخلی در تمامی واکنشها استفاده گردید که ناحیه بطول ۷۳۳ جفت باز از ژن بتا گلوبین انسانی می باشد. برای کنترل آلودگی از کنترل منفی استفاده شد که بجای DNA از بافر تریس - دی آمین تتراستیک اسید (TE) اسفاده شد. در هر واکنش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) براساس شناسایی نوع خاصی از ژنوتیپهای ویروس، کنترل مثبت حاوی آن ژنوتیپها بکار برده شد تا بتوان نوع ژنوتیپ ویروس موجود در نمونه ها را تعیین نمود (تصویر ۱).

واکنش تکثیر ناحیه مورد نظر از DNA در حجم کل ۲۵ میکرولیتر که شامل DNA ژنومی، پرایمرهای اختصاصی ژنوتیپ های ویروس، PCR-mix و بافر PCR و آنزیم Taq پلیمرز Hot start بود که تحت برنامه دمایی مشخصی انجام گردید. دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵°C و به دنبال آن ۴۲ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵°C مرحله اتصال پرایمر در ۶۳°C به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲°C بمدت ۱ دقیقه انجام شد و در نهایت دما به ۱۰°C کاهش یافت. فرآورده تکثیر یافته PCR پس از رنگ آمیزی با ۰/۵ μg/ml برومیداتیادیوم روی آگارز ۲٪ بمدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰ V/Cm الکتروفورز

پلامبولیسون و دیورتیکول، اسپروی سلیاک، اشعه تراپی و تایلوویس، عفونت قارچی غذاها، ویتامین ها، فلزات، روغن سوخته، هیدروکربن های پلی سیکلیک و نیتروزامین می باشند (۲). سرطان، پس از تصادف و بیماری قلبی عروقی شایعترین علت مرگ و میر در ایران است (۱ و ۳). در هر سال حدود ۵۱ هزار مورد جدید از ابتلا به سرطان در ایران تشخیص داده می شود. در ایران علت حدود ۳۵ هزار مورد مرگ، سرطان است. که حدود ۳۸٪ از این سرطانها از سیستم گوارش منشاء می گیرند. در این میان حدود ۶۵۰۰ مورد را سرطان مری تشکیل می دهد. لذا حدود ۵۸۰۰ مورد بعلت سرطان مری است (۴). عوامل خطرناک متعددی برای سرطان سنگفرشی مری مطرح گردیده است؛ از این میان ارتباط و تاثیر پاپیلوما ویروس انسانی (Human Papillomavirus, HPV) در منابع مختلفی مورد بحث قرار گرفته است (۵). بعضی از محققین به ارتباط بین بروز ازوفاژیت و آندوکارسینوم معده و سابقه گاسترکتومی گذشته با ESCC و برخی دیگر به شیوع همزمان کارسینوم سنگفرشی در اوروفارنکس و لارنکس اشاره کرده اند (۷). تا امروز بیشتر از ۱۰۰ گونه (HPV) شناخته شده است، اگرچه بیشتر این گونه ها با ضایعات خوش خیم مثل زگیل مقاربتی (کوندیلوما آکومیناتوم) همراهی دارند، که معمولاً توسط HPV گونه ۱۱ و ۱۶ ایجاد می شوند. این گونه ها به ترتیب در ۷۰٪ و ۹۰٪ این بیماران پیدا شده اند (۱).

گونه های مشخصی مثل HPV₁₆ و HPV₁₈ نقش ثابت شده ای در ایجاد تومورهای بدخیم دارند. مثلاً همراهی HPV با سرطان سرویکس به وضوح نشان داده شده است بطوریکه DNA HPV در بیشتر از ۹۵٪ این بدخیمی شناسایی شده است (۳ و ۴). همچنین نقش HPV به عنوان یک عامل سرطانزا در محدوده وسیعی از بدخیمی های اپی تلیالی شامل سرطانهای پوست، حفره دهان، مری، ملتحمه، لارنکس، ولو، واژن، آئوس، پیس و ریه نشان داده شده است. به علاوه ثابت شده که حدود ۱۰٪ بدخیمی هایی که در تمام دنیا ایجاد می شوند به آلودگی با HPV ارتباط دارند (۱۲-۸). در رابطه با نقش احتمالی و میزان اثر ویروس پاپیلوما انسانی در کارسینوم سلول سنگفرشی مری نیز مطالعات انجام شده نتایج متفاوتی داشته اند، به طوری که شیوع ژن HPV-L1 در کارسینوم سلول سنگفرشی مری ۳۶/۸٪، گونه HPV₁₆ ۱۳/۲٪ و گونه HPV₁₈ ۷/۹٪ بوده است (۱۳). با این وجود این ارتباط هنوز به روشنی مشخص نشده است (۷). با در نظر گرفتن میزان شیوع این سرطان در استان مازندران و عدم بررسی قبلی این ارتباط در منطقه مازندران، این مطالعه به منظور بررسی ارتباط پاپیلوما ویروس انسانی با ایجاد کارسینوم سلول سنگفرشی مری انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه مورد - شاهدهی بر روی ۴۰ نمونه بافتی مبتلا به سرطان مری به عنوان گروه مورد و ۴۰ نمونه بافتی غیر مبتلا به سرطان مری به عنوان گروه شاهد طی سالهای ۸۷-۱۳۸۰ انجام شد. برای موارد سرطان سنگفرشی از نمونه های سرطان عمل شده در بیمارستان امام خمینی ساری استفاده شد و از آندوسکوپی استفاده نگردید. تمامی بیماران سرطان سنگفرشی مری بدون محدودیت سن و جنس در این محدوده زمانی وارد مطالعه گردیدند. گروه شاهد از بیمارانی انتخاب شد که بدلیل دیگری تحت بیوپسی مری قرار گرفته و شامل موارد مشکوک از نظر ازوفاژیت، ریفلاکس و یا بررسی از نظر ازوفاژیت

شایعترین ژنوتیپهای HPV موجود در نمونه های سرطان سنگفرشی مری مربوط به ژنوتیپ ۱۶ و ۴۵، هر یک ۶ مورد بود. شایعترین grade (درجه تمایز تومور) در میان نمونه های سرطان سنگفرشی مری به ترتیب، grade 1 (۵۷/۵٪)، سپس grade 2 (۳۷/۵٪) و از همه ناشایعتر grade 3 (۵٪) بود. همچنین شایعترین grade در میان نمونه های آلوده به HPV بترتیب grade 1 (۶۰٪)، سپس grade 2 (۳۳/۳۳٪) و از همه ناشایعتر grade 3 یک مورد (۶/۶۶٪) بود. ارتباطی بین ژنوتیپ HPV و grade تومور سلول سنگفرشی مری وجود نداشت (جدول ۱). ارزیابی نمونه های پارافینی بیماران مبتلا به SCC مری از نظر وضعیت مرحله تومور (stage) نشان داد که بیشترین نمونه ها در مرحله T₃ (۲۳ نمونه - ۵۷/۵٪) و سپس مرحله T₂ (۱۲ نمونه - ۳۰٪) قرار داشتند. در بین نمونه های سرطان سلول سنگفرشی مری که آلودگی HPV در آنها به اثبات رسید شایع ترین stage را T₃ با ۷ مورد (۴۶/۷٪) و سپس T₂ (۳۳/۳۳٪)، T₁ (۱۳/۳۳٪) و T₀ (۶/۶۶٪) تشکیل داد که در بررسی آماری ارتباطی بین ژنوتیپ HPV و stage تومور وجود نداشت (جدول ۲).

در خصوص درگیری غدد لنفاوی از کل ۴۰ نمونه سرطان سلول سنگفرشی در ۶ مورد (۱۵٪) درگیری یک غده لنفی، در ۴ مورد (۱۰٪) دو غده لنفی، در ۲ مورد (۵٪) سه غده لنفی درگیر بود و درگیری ۴، ۵ و ۷ غده لنفی هرکدام یک مورد (۲/۵٪) مشاهده شد. در کل ۳۷/۵٪ از نمونه های سرطان سنگفرشی مری (۱۵ نمونه) درگیری غده لنفی داشتند.

از ۱۵ نمونه سرطان سنگفرشی مری آلوده به HPV، ۸ نمونه فاقد درگیری غده لنفی بود، ۳ نمونه درگیری یک غده لنفی، ۲ نمونه درگیری دو غده لنفی، یک نمونه درگیری سه غده لنفی و یک نمونه درگیری هفت غده لنفی داشت، که در بررسی آماری ارتباط معنی داری بین آلودگی به HPV و درگیری لنف نود وجود نداشت.

جدول ۱. ارتباط بین ژنوتیپ ویروس آلوده کننده سلولهای سرطانی با درجه تمایز (grade) تومور در بیماران مبتلا به سرطان سنگفرشی مری

ژنوتیپ HPV	Grade 1	Grade 2	Grade 3
۱۶	۴(۶۶/۷)	۲(۳۳/۳)	-
۴۵ و ۱۶	۳(۱۰۰)	-	-
۴۵	۲(۳۳/۳)	۳(۵۰)	۱(۱۶/۷۳)
جمع	۹(۶۰)	۵(۳۳/۳)	۱(۶/۶۶)

جدول ۲. ارتباط بین ژنوتیپ ویروس آلوده کننده سلولهای سرطانی با مرحله (stage) بیماران مبتلا به سرطان سنگفرشی

ژنوتیپ HPV	Stage T ₃	Stage T ₂	Stage T ₁	Stage T ₀
16	۲(۳۳/۳۳)	۳(۵۰)	۱(۱۶/۶۶)	-
16, 45	۲(۶۶/۷)	-	۱(۳۳/۳۳)	-
45	۳(۵۰)	۲(۳۳/۳۳)	-	۱(۱۶/۶۶)
جمع	۷(۴۶/۶۶)	۵(۳۳/۳۳)	۲(۱۳/۳۳)	۱(۶/۶۶)

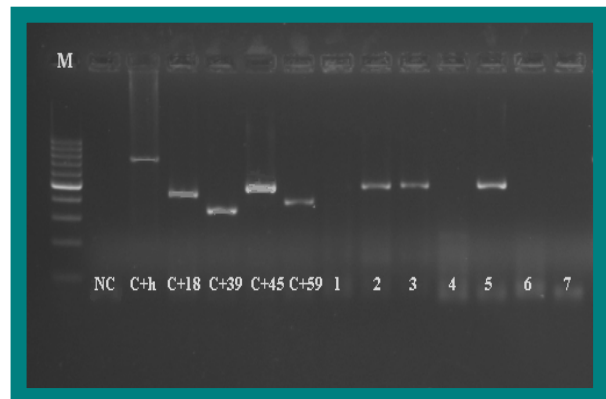
گردید و تحت نور ماورای بنفش باندهای تکثیر یافته ظاهر شدند (تصویر ۱). ارتباط بین عفونت پاپیلوما ویروس انسانی با کارسینوم سلول سنگفرشی مری، جنس، سن، سطح بندی انتشار Staging تومور و درجه بندی میکروسکوپی Grading تومور و همچنین تعیین شایعترین تیپ HPV دخیل در SCC مری با استفاده از آزمون مربعات دقیق فیشر ارزیابی شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین سنی بیماران مبتلا به سرطان سنگفرشی مری 47.59 ± 1.33 سال در طیف سنی ۴۱ تا ۷۹ سال بود. همچنین میانگین سنی گروه شاهد 56.9 ± 1.42 سال در طیف سنی ۳۶ تا ۸۷ سال بود که تفاوت آماری معنی داری نداشتند. از ۴۰ بیمار مبتلا به ESCC ۲۰ نفر (۵۰٪) مونث و ۲۰ نفر (۵۰٪) مذکر بودند. همچنین در گروه شاهد ۱۹ نفر زن (۴۷/۵٪) و ۲۱ نفر مرد بودند که دو گروه از نظر جنسی تفاوت آماری معنی داری نداشتند. از ۴۰ نمونه بافتی سرطان سلول سنگفرشی مری (SCC) ۱۵ نمونه (۳۷/۵٪) در آزمون PCR از نظر HPV-DNA مثبت بودند و ۲۵ مورد بقیه (۶۲/۵٪) منفی بودند. در مقابل در گروه شاهد نمونه های بافتی بیماران فاقد بدخیمی سلول سنگفرشی مری از مجموع ۴۰ نمونه PCR شده فقط ۵ نمونه (۱۲/۵٪) از نظر HPV-DNA مثبت بودند و بقیه (۸۷/۵٪) منفی بودند که این تفاوت معنی دار بود ($p = 0.03$)

در میان ۱۵ نمونه SCC آلوده به ویروس HPV، ۸ مورد (۵۳/۳٪) از نمونه ها مربوط به جنس مونث و ۷ نمونه (۴۶/۷٪) مربوط به جنس مذکر بود. تفاوت جنسی از نظر آماری معنی دار نبود.

در گروه مورد ۶ نمونه (۱۵٪) و در گروه شاهد ۳ نمونه (۷/۵٪) از نظر HPV16-DNA و به ترتیب ۶ نمونه (۱۵٪) و ۲ نمونه (۵٪) از نظر HPV45-DNA مثبت بودند، در حالیکه وجود همزمان HPV16-DNA و HPV45-DNA در سه نمونه از بافتهای مربوط به سرطان سنگفرشی مری مثبت بود و هیچکدام از نمونه های شاهد بطور همزمان این دو DNA را نشان ندادند (تصویر ۱). همچنین در این مطالعه هیچ موردی از HPV18-DNA مشاهده نشد.



تصویر ۱. نمونه ای از PCR انجام شده برای بیماران مبتلا به سرطان سنگفرشی مری (بیماران شماره ۲، ۳ و ۵ از نظر HPV45 مثبت هستند).

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپهای ویروس HPV در نمونه های بافتی نشان داد که ۱۵ نمونه از ۴۰ نمونه SCC مری (۳۷/۵٪) از نظر HPV DNA مثبت بودند؛ در مقابل در گروه شاهد فقط ۵ نمونه (۱۲/۵٪) از این نظر مثبت بودند. این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود. بدین معنی که شیوع HPV در نمونه های SCC مری بوضوح بیشتر از نمونه های غیرسرطانی بود. در نمونه های SCC مری HPV₁₆ (۱۵٪) و HPV₄₅ (۱۵٪) شایعترین تیپهای HPV مشاهده شده، بودند و ۷/۵٪ از نمونه های SCC مری بطور همزمان حضور این دو ویروس (HPV₁₆ و HPV₄₅) را نشان دادند. همزمانی عفونت با این ویروس در هیچ بیمار در گزارشات قبلی با این شیوع گزارش نشده بود.

در نمونه های بافتی غیرسرطانی مری HPV₁₆ در ۷/۵٪ و HPV₄₅ در ۵٪ از نمونه ها مشاهده شد. نکته قابل توجه مطالعه ما که آنرا از سایر مطالعات مشابه متمایز می کند استفاده از نمونه های بافتی حاصل از ازوفاز کتومی بجای نمونه های بیوپسی (که در اغلب مطالعات مشابه مورد استفاده قرار گرفته اند) می باشد که تهیه نمونه کافی و مناسب بافت سرطانی را میسر ساخت. با توجه به شیوع بیشتر عفونت با HPV در نمونه های SCC مری می توان گفت احتمالاً HPV در بروز SCC مری نقش دارد. در مطالعه مشابهی که Abbaszadegan و همکاران در مشهد انجام دادند، در ۲۰٪ از نمونه های سرطان سنگفرشی مری HPV₁₆ مشاهده شده، در حالیکه هیچ موردی از HPV₁₈ وجود نداشته است (۱۴). از سایر مطالعات مشابه در ایران می توان به مطالعه Tahmasebi و همکاران در بیمارستان دکتر شریعتی تهران اشاره نمود که در آن مطالعه ۳۶٪ از نمونه های ESCC و فقط ۱۳/۲٪ از نمونه های بیوپسی مری افراد طبیعی برای مارکر عمومی HPV مثبت بودند (۱۵). همسو با نتایج مطالعه ما Moradi و همکاران در مطالعه ای بر روی بیماران ESCC ترکمن صحرا (گرگان، گنبد کاووس و بندر ترکمن) نشان دادند که از ۱۱۲ نمونه ESCC ۵۳ نمونه HPV مثبت بودند که در ۵۴٪ از آنها انواع ۱۶ و ۱۸ غالب بوده است (۶). در مطالعه ما هیچ موردی از HPV₁₈-DNA مشاهده نشد. در سایر مطالعات مشابه انجام شده در ایران: هیچ یک از نمونه های شاهد از نظر HPV₁₆ (E6/E7) مثبت نشدند اما ۳ مورد (۱۳/۲٪) از نمونه های SCC مری مثبت شدند، همچنین ۳ مورد (۷/۹٪) از نمونه های SCC مری و ۵ مورد (۱۳/۲٪) از نمونه های کنترل از نظر HPV₁₈ (E6/E7) مثبت شدند (۱۳). در حالیکه در مطالعه Khadem ALmelleh و همکاران از ۱۷ بیمار مبتلا به سرطان سلول سنگفرشی ۱۱ نفر (۶۴/۷٪) و از ۱۷ بیمار غیر مبتلا به این سرطان ۱۳ نفر (۷۶/۴٪) مبتلا به ویروس پاپیلوم انسانی بودند (۵).

در گروه شاهد مطالعه ما هیچ موردی از ژن HPV₁₆ E7/E6 مشاهده نشد، اما در ۱۳/۲٪ از نمونه های ESCC، این ژنوتیپ وجود داشت. با در نظر گرفتن اینکه ایران یکی از نواحی بسیار پر خطر برای سرطان مری است (۸۰۹) و بررسی ما در شمال ایران با نسبت شیوع ESCC تا بیش از ۱۰۰ نفر در هر صدهزار نفر در سال انجام گرفته، بنابر این باید HPV را عاملی قوی در افزایش شیوع ESCC در ایران به شمار آورد.

در خصوص نقش HPV در ایجاد ESCC در سایر نقاط دنیا نیز مطالعات متعددی انجام شد که نتایج متفاوتی را همراه داشته است. مطالعات انجام شده در مناطق پرخطر مثل چین، آفریقای جنوبی و ژاپن موید نقش HPV در ایجاد

ESCC بوده است (۴-۶). اما مطالعات انجام شده در مناطق کم خطر جهان برای ESCC وجود ارتباط بین HPV و این سرطان تأیید نشده است (۱۸-۱۶). Koh و همکارانش هیچ موردی از HPV را در نمونه های سرطانی مری پیدا نکردند (۱۷). در مطالعه Shuyama و همکارانش HPV DNA در ۱۷ مورد (۶۵٪) از نمونه های بیماران منطقه Gansu که کانسر سلول سنگفرشی مری در آنجا شایع تر بود و ۲ مورد (۶٪) از نمونه های بیماران منطقه Shangung مثبت شد (۱۹). در مطالعه دیگری در چین Yao و همکارانش دریافتند که شیوع مثبت شدن HPV (E6/E7-16/18) در نمونه های SCC بیماران سه نقطه مختلف چین به ترتیب ۴۵٪، ۳۶/۶٪ و ۳۷/۵٪ بود، در حالیکه تمامی نمونه های نرمال مری منفی بودند (۲۰). همچنین در مطالعه مشابهی که Kamath و همکارانش در آمریکا انجام دادند، سکانسهای HPV (HPV₅₄) تنها در یک نمونه ESCC مثبت شد و بقیه ۴۵ نمونه منفی بودند (۱۶).

بر طبق مکانیسم ضربه و فرار (hit-and-run) وجود ویروس پاپیلومای گاوی در مراحل اولیه سرطانزایی در پیش روده گاو الزامی است، اما برای پیشرفت و ایجاد بدخیمی ضروری نیست (۱۵). ممکن است چنین مکانیسمی در خصوص ایجاد سرطان مری توسط HPV هم صادق باشد که با فرض صحت وجود این مکانیسم در ایجاد ESCC می توان چنین فرض کرد که در سایر نمونه های ESCC مطالعه ما که از نظر HPV منفی بوده اند در ابتدای مسیر سرطانی شدن مخاط نرمال، HPV وجود داشته اما در هنگام بررسی توسط PCR ناپدید شده بودند که در این صورت شیوع بالاتری را خواهد داشت. به نظر می رسد استفاده از بافت سالم اطراف تومور بتواند در اثبات این مکانیسم کمک کننده باشد، لذا توصیه می شود این مطالعه بر روی بافت سالم بیماران مبتلا به ESCC انجام شود.

مطالعه ما نشان داد مرحله تومور، درجه تمایز تومور، سن، جنس و تعداد لنف نودهای درگیر توسط سرطان سنگفرشی مری با وجود HPV ارتباطی نداشته است. این یافته با نتایج Khadem AL melleh و همکاران در زنجان همخوانی دارد (۵). همچنین در مطالعه دیگری Yao و همکارانش نیز دریافتند که هیچ ارتباطی بین حضور HPV در نمونه های SCC مری با درجه تمایز آن، وجود نداشت (۲۰). شاید بتوان عدم وجود ارتباط بین درگیری لنف نود، درجه تمایز و مرحله تومور را با مکانیسم ضربه و فرار توجیه کرد. بدین مفهوم که در ابتدای ایجاد سرطان، HPV وجود داشته اما در ادامه حذف شده است. یعنی در مرحله ای که تومور تکثیر یافته، از نظر بالینی علامت دار شده و لنف نود ها را درگیر نموده و ویروس حذف شده است و ما نتوانسته ایم آنرا در بررسی خود پیدا کنیم. با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده می توان اذعان داشت که عفونت با ویروس HPV یک عامل خطر ساز برای سرطان سنگفرشی مری در منطقه شمال ایران می باشد. با توجه به نتایج این مطالعه و شیوع بالای این سرطان در منطقه اهمیت توجه به این ویروس و کنترل عفونت و پیشگیری از انتقال آن، از نظر بهداشتی اهمیت بسزائی پیدا می کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت مالی از تحقیق و از پرسنل بخش پاتولوژی بیمارستان های امام خمینی (ره) و بوعلی سینا ساری تشکر و قدردانی می گردد.

Correlation of Human Papillomavirus Infection with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

O. Emadian (MD)¹, F. Naghshvar (MD)¹, A.R. Rafiei (PhD)², I. Maleki (MD)^{*3},
Zh. Torabizadeh (MD)¹, M. Rezaei Far (MD)¹

1. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Molecular Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(4); Jul 2011

Received: Dec 4th 2010, Revised: Feb 9th 2011, Accepted: Apr 27th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Human Papillomavirus (HPV) plays an important role in the genesis of cancers of cervix and oral cavity. Squamous epithelium of esophagus is an appropriate site for HPV infection. The aim of this study was to determine the correlation of this infection with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: In a case-control study forty cases of ESCC and forty controls with nonmalignant specimens from the patients referred to Imam Khomeini hospital–Sari (Mazandaran, Iran) during eight years (2001-2008) were enrolled. Extracted DNAs from the specimens were analyzed for HPV DNA with the commercial kits available for HPV.

FINDINGS: Fifteen (37.5%) cases of ESCC and 5 (12.5%) specimens of controls were positive for HPV DNA ($p=0.03$). The most common genotypes in the ESCC patients and control group were HPV₁₆ & HPV₄₅ (each 15% for ESCC patients; HPV₁₆ 7.5% and HPV₄₅ five percent for the controls). There was no significant difference for HPV genotype and patient's age, sex or tumor's stage and grade.

CONCLUSION: HPV may be counted as an important risk factor for ESCC in northern region of Iran.

KEY WORDS: *Human papillomaviruses, Esophageal squamous cell carcinoma, Polymerase chain reaction (PCR).*

*Corresponding Author;

Address: Department of Internal Medicine, Imam Khomeini Hospital, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Tel: +98 151 2261701-4

E-mail: iradj2001@yahoo.com

References

1. Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. Robbins pathologic basis of disease. 7 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co 2005; pp: 806-7.
2. Souza RF. Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy--esophageal carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11(2):257-72.
3. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
4. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, 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* 1995;87(11):796-802.
5. Khadem Al Melleh AR, Jamalian A, Alaei S. Investigation of coexistence of human papilloma virus with esophageal squamous cell carcinoma in patients referring to Vali-e-Asr hospital in Zanjan 2002-2003. *J Zanjan Univ Med Sci* 2005;12(49):29-34. [in Persian]
6. Moradi A, Mokhtari-Azad T, Mahmoudi M, Hazrati B. Frequency of human papillomaviruses in patients with esophageal Cancer in Golestan province. *Tabib-e-Shargh, Zahedan J Res Med Sci* 1999;1(2):59-67. [in Persian]
7. Rosei J. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th ed. Edinburgh: Mosby 2004; pp: 625-7.
8. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;(31):57-65.
9. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995;64:1-378.
10. Nadji SA, Mokhtari-Azad T, Mahmoodi M, et al. Relationship between lung cancer and human papillomavirus in north of Iran, Mazandaran province. *Cancer Lett* 2007;248(1):41-6.
11. Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(10):721-8.
12. Zur Hausen H. Papillomaviruses in Human Cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111(6):581-7.
13. Farhadi M, Tahmasebi Z, Merat S, Kamangar F, Nasrollahzadeh D, Malekzadeh R. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population. *World J Gastroenterol* 2005;11(8):1200-3.
14. Abbaszadegan MR, Omidi AA, Niyazi AA, et al. Prevalence of Human Papillomavirus types 16 & 18 and expression of p53 mutant protein expression in esophageal squamous cell carcinomas. *Iran J Basic Med Sci* 2003;6(1):38-42.
15. Tahmasebi Fard Z, Farhadi Langroody M, Malekzadeh R, Merat S, Nasrollahzadeh D, Kamangar F. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population. *Govaresh* 2004;9(1):22-6. [in Persian]
16. Kamath AM, Wu TT, Heitmiller R, Daniel R, Shah KV. Investigation of the association of esophageal carcinoma with human papillomaviruses. *Dis Esophagus* 2000;13(2):122-4.
17. Koh JS, Lee SS, Baek HJ, Kim YI. No association of high-risk human papillomavirus with esophageal squamous cell carcinomas among Koreans, as determined by polymerase chain reaction. *Dis Esophagus* 2008;21(2):114-7.
18. Kok TC, Nooter K, Tjong-A-Hung SP, Smits HL, Schegget JT. No evidence of known types of human papillomavirus in squamous cell cancer of the oesophagus in a low-risk area. *Eur J Cancer* 1997;33(11):1865-8.
19. Shuyama K, Castillo A, Aguayo F, et al. Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China. *Br J Cancer* 2007;96(10):1554-9.
20. Yao PF, Li GC, Li J, et al. Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12(9):1352-5.