مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره ششم، بهار ۱۳۹۱

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی ارتباط بین پاپیلوماویروس انسانی و ضایعات اندومتریوزیس

زهرا معینی [۱]، زهرا طهماسبی فرد*[۲]، افشین عبدی راد[۳]، سیده مریم سید علی روته[۱]، سهیلا سرمدی[۳]

[۱] کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، باشگاه پژوهشگران جوان، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، تهران، ایران
[۳] دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اندومتریوزیس یک اختلال ژنیکولوژی شایع است که اطلاعات کمی در موردش وجود دارد. این بیماری با وجود بافت اندومتریال رحمی، در فضای بیرون رحمی مشخص می‌شود و عمدتاً با درد شدید لگن و یا نازایی همراه ست. ما فرض کردیم که عفونت های ویروسی آندومتر نظیر HPV (Human Papillomavirus)، می‌توانند توانایی تهاجم لایه بازال را خصوصاً همراه با بدرون برگشتگی قاعدگی بداخل شکم یا درون عضلات رحمی افزایش دهند.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۴۶ بلوک پارافینی اندومتریوزیس و۵۰ بلوک پارافینی نرمال اندومتر به عنوان شاهد انتخاب شدند. پس از استخراج DNA، همه نمونه‌ها برای حضور ژن بتاگلوبین بررسی شده و نمونه‌های مناسب برای حضور ژن L1 HPV- Common با PCR (Polymerase Chain Reaction) جستجو شدند.

یافته ها: HPV بوسیله PCR در ۱۱ مورد از ۴۳ (۲۵/۵۸٪) نمونه بافت اندومتریوزیس و ۷ مورد از ۴۳ (۱۶/۲۷٪) نمونه بافت اندومتر شناسایی شد. در مجموع از ۸۶ نمونه، ۱۸ مورد (۲۰/۹۳ ٪) با مارکرهای عمومی HPV مثبت بودند.

نتیجه گیری: عفونت HPV در ضایعات اندومتریوزیس مشابه بافت های کنترلی بوده و از گسترش ویروس بوسیله سلول های اندومتر آلوده به HPV از طریق بدرون برگشتگی قاعدگی حمایت می‌کند. بخاطر ارتباط HPV با سرطان ها، پایداری عفونت HPV در ضایعات اندومتریوزیس نیز می‌تواند به پیشرفت بدخیمی کمک نماید.

کلمات کلیدی: اندومتریوزیس، پاپیلوماویروس انسانی (HPV)، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

مقدمه

اندومتریوزیس یک بیماری پیچیده با بافت های شبیه اندومتر است که در محل های بیرون از رحم یافت می‌شود. گرچه علائم آن بسیار متغیر است ولی معمولاً با درد شدید لگن، خونریزی های دیسمنوره (دوره های ماهیانه دردناک) و کاهش باروری همراه است (۱۲،۷). فرایندهای اصلی پاتولوژیکی مرتبط با بیماری، التهاب صفاق، فیبروز و تشکیل کیست های چسبنده تخمدان می‌باشد (۷). هنوز مشخص نشده که چگونه بافت ها در محل نادرست قرار می‌گیرند و می‌توانند ضایعات اندومتریوتیک را گسترش دهند. احتمالاً فاکتورهای ایمونولوژیکی شخص همراه با عفونت های ویروسی حساسیت به اندومتریوزیس را افزایش می‌دهند (۱۶، ۱۷). مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهد که پاپیلوما ویروس ها نقش اصلی را در گسترش انواع مختلف ضایعات رحمی دارند. بنابر این بعنوان عوامل عفونی اصلی در ضایعات ژنیتال و همچنین سرطان ها در نظر گرفته می‌شوند (۵). خانواده پاپیلوماویروس ها HPV از جمله ویروس هایی هستند که بیش از ۲۰۰ نوع متفاوت از آن ها شناسایی شده (۱۹) و بیش از ۴۰ نوع مختلف آن از دستگاه

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، تهران، ایران
Email:Ztahmasebi@riau.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۰۶

تناسلی جدا شده است. برخی از آن ها بطور پایدار در زنان آلوده باقی مانده و سبب گسترش نئوپلازیای رحمی می‌شوند (۸). این ویروس ها در دو گروه کم خطر و پرخطر بالا دسته بندی می‌شوند. فعالیت تغییر شکل دهندگی انواع با پر خطر بالای آن ها، به انکوپروتئین های E۶ و E۷ مرتبط می‌شود که به ترتیب غیر فعال کردن P۵۳ و pRb را بر عهده دارند (۶) P۵۳ و pRb بطور نرمال تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلول) را کنترل می‌کنند. اختلال در عملکرد بیولوژیکی طبیعی آن ها، سلول را در معرض بدخیمی پیشرونده قرار می‌دهد (۱۰). عفونت پاپیلوماویروس ها در دستگاه تناسلی زنان با محل های خاص نظیر فرج، مهبل، گردن رحم ، اپی‌تلیوم خاص و سلول های اپی‌تلیوم طبقه بندی شده ارتباط داشته و اغلب به تکثیر سلول اپی‌تلیال و بدخیم شدن آن ها منتهی می‌شود (۱۸،۱۱). فرآیندهای بدخیمی و ایمونولوژیکی اندومتریوزیس نیز نشان دهنده احتمال وجود آلودگی با عوامل عفونی است (۱۵). در این مطالعه حضور پاپیلوما ویروس، به عنوان مهم ترین ویروس مرتبط با دستگاه تناسلی، در ضایعات اندومتریوزیس و بافت اندومتر زنان سالم مورد بررسی قرار گرفته است و برای شناسایی انواع متفاوت ویروس، از پرایمرهای عمومی ژن L۱ استفاده شده است.

مواد و روش ها

تهیه نمونه و استخراج DNA

در این تحقیق ۴۶ بلوک پارافینی اندومتریوزیس و۵۰ بلوک پارافینی نرمال اندومتر به عنوان شاهد از بیمارستان های امام خمینی و میرزا کوچک خان تهران جمع آوری شد. افراد انتخاب شده به عنوان شاهد، از نظر سنی در طیف سنی افراد بیمار قرار داشتند. با استفاده از اسکالپل و دستکش جداگانه برای هر نمونه و با مراقبت زیاد برای جلوگیری از آلودگی، برش های بسیار نازک ۱۰ میکرونی به تعداد ۴ عدد از بلوک های پارافینی تهیه شد و در میکروتیوپ های ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف فاقد DNase/RNase ریخته شد. پس از دپارافینه کردن با Xylene و اتانول مطلق، بافت ها با پروتئیناز K کاملاً هضم شدند و در انتها برای غیر فعال کردن پروتئیناز K نیز از گرما استفاده شد. سپس با روش استخراج فنل-کلروفرم (۲) DNA ی نمونه‌ها استخراج گردید.

ارزیابی خلوص و کیفیت DNA ی استخراج شده

مقدار و خلوص DNAی استخراج شده با استفاده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین شد. نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) طول موج های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه‌هایی که این نسبت را در حدود ۱/۷ تا ۲ داشتند برای انجام PCR استفاده شدند. از طرف دیگر حدود ۲ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شد تا آلودگی‌های احتمالی مشاهده شوند. پس از استخراج DNA، تمامی نمونه‌ها با پرایمرهای ژن بتاگلوبین PCR شدند تا محصولات bp ۲۵۰ بر روی ژل ظاهر گردند.

انجام واکنش PCR برای ژن L۱ HPV

تمامی نمونه‌های بتاگلوبین مثبت، برای شناسایی HPV-DNA تکثیر شدند. برنامه تکثیر شامل یک چرخه، مرحله تخریب اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای سه دقیقه (تا جدا شدن کامل DNA هدف صورت گیرد) و ۴۵ سیکل شامل تخریب دو زنجیره در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و در انتها مجدداً در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه باقی ماندند تا اطمینان حاصل شود که کاملاً محصول طویل شده است. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ که به آن رنگ اتیدیوم بروماید نیز افزوده شده بود، الکتروفورز شدند تا قطعات bp ۴۵۰ بر روی ژل آشکار گردد. در تمامی مراحل برای شناسایی آلودگی‌های احتمالی از کنترل منفی (نمونه آب بجای DNA) استفاده شد. کنترل مثبت استفاده شده نیز نمونه DNA استخراج شده از بافت سرطان رحم آلوده به HPV-۱۶ بود که برای اطمینان از نوع.ویروس، تعیین توالی نیز شده بود.

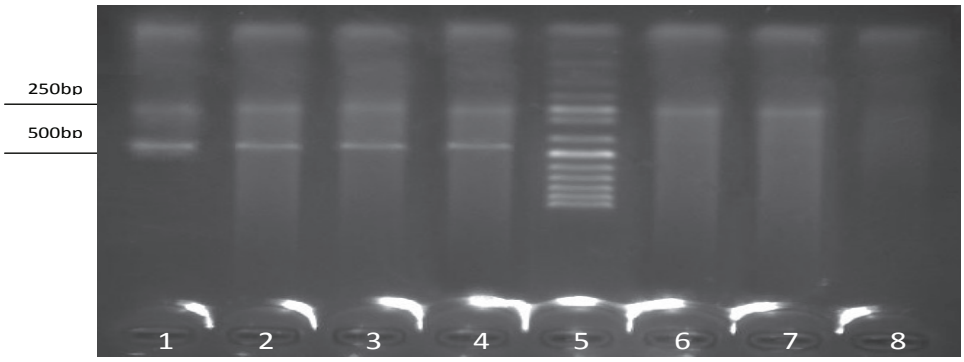
یافته‌ها

نتایج حاصل از تکثیر ژن بتاگلوبین نشان می‌داد که از ۴۶ نمونه حاوی بافت اندومتریوزیس ۳ نمونه و از ۵۰ نمونه بافت اندومتر نرمال ۷ نمونه از لحاظ کیفی جهت تست PCR مناسب نبودند.

جدول ۱ - توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن بتا گلوبین و ژن L۱-HPV

Primer		´Sequence 5´→3	Description	PCR Product PCR
B-globin	Forward	‘GCTCGGTGCCTTTAGTGATGG 3 ‘5		250bp
	Reverse	‘CGATCCTGAGACTTCCACACTG 3 ‘5		
HPV-Com-mon	Forward	‘CgTCCMARRggAWACTgATC 3 ‘5	g=G/C R=A/C W=A/T M=A/T	450bp
	Reverse	‘gCMCAggWCATAAYAATgg 3 ‘5	g=G/C M=A/C W=A/T Y=C/T	

زیرا تکثیر ژن بتاگلوبین نشان می‌دهد که نمونه DNA برای آنالیز مناسب بوده و هیچ ممانعت کننده PCR وجود ندارد. تمامی DNAهای مناسب، با پرایمرهای عمومی HPV تکثیر شدند. نتایج بیانگر این بود که از ۴۳ نمونه بافت اندومتریوزیس ۱۱ مورد (۲۵/۵۸٪) و از ۴۳ نمونه بافت اندومتر ۷ مورد (۱۶/۲۷٪) مثبت شدند. در مجموع از ۸۶ نمونه مورد بررسی ۱۸ مورد (۲۰/۹۳) مثبت مشاهده شد و باند bp ۴۵۰ حاصل تکثیر HPV-Common بر روی ژل ظاهر گردید. شکل ۱ باندهای حاصل از تکثیر ژن بتاگلوبین و ژن L۱ -HPV است که در تعدادی از نمونه‌های مثبت و منفی به همراه مارکر و کنترل مثبت و کنترل منفی نشان داده شده است.



شکل ۱- نشان دهنده تکثیر ژن بتاگلوبین در تعدادی از نمونه‌های مثبت و منفی در کنار مارکر و کنترل مثبت و منفی:
چاهک شماره ۱:کنترل مثبت، ۲ و ۳ و ۴:نمونه مثبت، ۵: سایز مارکر،۶ و ۷:نمونه منفی، ۸:کنترل منفی.

بحث

اندومتریوزیس یک بیماری چند عاملی و پیچیده است که فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در آن دخیلند. این بیماری خصوصیاتی مشابه بدخیمی نظیر تهاجم و گسترش پیشرونده به ارگان های مجاور را نشان می‌دهد (۳). اندومتریوزیس به صورت یک بیماری مرموز باقی مانده است. بخشی از آن به خاطر فقدان مدل های حیوانی مناسب برای آن است. مدل اندومتریوزیس بابون، فنوتیپ های بیماری خیلی مشابه با آن چه که در زنان یافت می‌شود، را نشان می‌دهد. یکی از فواید این مدل قرار دادن بافت اندومتر بیرونی در محل های خاصی یا در زمان های خاصی از چرخه ماهانه است (۱). شیوع بالای بیماری های خود ایمنی، درد های مزمن و حالت های خستگی در زنانی که جراحی اندومتریوزیس داشته‌اند، همواره گزارش می‌شود. ناهنجاری ها و تغییرات پاسخ های ایمنی همچنین التهاب در زنان مبتلا به اندومتریوزیس هموار مورد توجه بوده زیرا آن ها را به داشتن سرطان و عفونت ها مستعد می‌نماید (۴). تحقیقات نشان می‌دهد که آپوتپوز در سلول های اندومتریوزیس نسبت به زنان سالم کاهش دارد (۱۵). از آنجا که انواع با پر خطر بالا HPV مثل ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳ و ۴۵ که به طور پایدار در دستگاه تناسلی باقی می‌مانند، می‌توانند با تولید پروتئین E۶، منجر به تخریب P۵۳ (آپوتپوز یا توقف چرخه سلولی را در پاسخ به صدمه DNA القا می‌کند) (۱۴) شده و آپوتپوز را مهار کنند (۲۱) و از طرف دیگر، حضور DNA HPV در چندین سرطان زنان با روش PCR گزارش شده است (۹). بنابر این، این ویروس می‌تواند به عنوان یکی از عوامل دخیل مورد بررسی قرار گیرد. همه انواع HPV از هر دو نوع کم خطر و پر خطر بالا در بافت های اندومتر شناسایی شده‌اند. در تحقیقی که توسط oppelt و همکارانش انجام شد ژن HPV L۱ به روش PCR در بافت های اندومتر و اندومتریوزیس تکثیر شد سپس با روش الایزا و با استفاده از هیبریداسیون پروب ها، انواع کم خطر و خطرناک ویروس شناسایی گردید. آن ها ۶۲ نمونه بیمار اندومتریوزیس و ۲۹ بافت اندومتر به عنوان کنترل مورد بررسی قرار دادند و از این تعداد ۷ تا از ۶۲ مورد (۱۱/۳٪) و ۸ تا از ۲۹ مورد کنترلی (۲۷/۵٪) برای DNA-HPV مثبت گزارش شد (۹). به علاوه در تحقیقی که توسط Ruth و همکارانش بر روی سلول های سرطانی منتقل شده transitional cell carcinoma (TCC) دستگاه تناسلی انجام گرفت، ۴ تا از ۶ (۶۷٪) نمونه بدست آمده از رحم و ۲ نمونه از ۸ (۲۵٪) نمونه تهیه شده از اندومتریوم برای HPV-۱۶ مثبت بودند (۱۳). در بررسی دیگری، میزان پائینی از شیوع DNA ویروس ها در بافت های اندومتریوزیس و اندومتر گزارش شده است. Vestergaard و همکارانش بر روی ۲۰ نمونه از بافت اندومتر بدون داشتن اندومتریوزیس و ۳۲ نمونه حاوی بافت اندومتریوزیس مطالعه کردند. آن ها برای شناسایی ویروس از ژن L۱ آن استفاده نمودند. نتایج آن ها نشان می‌داد که تنها ۳٪ نمونه‌های اندومتریوزیس و ۱۰٪ نمونه‌های کنترلی حاوی DNA-HPV بودند (۱۵). دلایل متعددی برای کسب نتایج متغیر مطرح است که از جمله آن ها، تنوع ژنتیکی میزبان و ویروس، تفاوت در روش های تشخیصی بکار رفته، استفاده از بلوک های پارافینه (بخاطر قطعه قطعه شدن DNA در هنگام استخراج) دخول ژنوم ویروسی بدرون ژنوم میزبان که در این صورت تنها ژن های E۶ و E۷ باقی می‌مانند (این موضوع در سرطان رحم مشاهده شده است) همچنین از دست رفتن یا بیان نشدن ژن L۱ که در بیشتر تحقیقات از آن استفاده می‌شود از موارد مهمی هستند که می‌توان به آن ها اشاره کرد (۲۱). در تحقیق حاضر، از روش PCR برای تکثیر ژن HPV L۱ در انواع متفاوت آن استفاده شد. نتایج ما نشان می‌داد که از ۴۳ نمونه بافت اندومتریوزیس ۱۱ مورد (۲۵/۵۸٪) و از ۴۳ نمونه بافت اندومتر ۷ مورد (۱۶/۲۷٪) مثبت شدند. این نتایج نشان می‌دهد که پاپیلوماویروس می‌تواند به عنوان یکی از عوامل آلودگی موجود در بافت های منتقل شده به محل های خارج رحمی، مورد بررسی‌های بیشتر اپیدمیولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی قرار گیرد. انجام مطالعات بیشتری لازم است تا در صورت اثبات نقش ویروس در ایجاد اندومتریوزیس، بتوان با استفاده از داروهای ضد ویروسی مناسب در برنامه بهداشتی جوامع در خطر، از شیوع آن جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن و حمایت های ریاست محترم آن واحد جناب آقای دکتر حیدری انجام گرفته است. ضمناً از معاونت محترم پژوهشی بیمارستان امام خمینی و بیمارستان میرزا کوچک خان که در تهیه نمونه‌های آزمایشگاهی کمال همکاری را داشتند و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

(1)- Anne J, Gemmill L, Stratton P, Sean DCl, Ballweg ML , Sinaii N. Cancers, Infections, and Endocrine Diseases in Women with Endometriosis. Fertil Steril. Author manuscript; available in PMC 2010 October 1.

(2)- Hsieh YY, Tsai FJ, Chang CC, Chen WC,Tsai CH, Tsai HD,Lin CC. p21 Gene Codon 31 Arginine/Serine Polymorphism:Non-Association With Endometriosis. J Clin Lab Anal, 2001; 15:184–187.

(3)- Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings J M, Jackson KS, Wu Y, Guo S W, Fazleabas AT. Altered Expression of HOXA10 in Endometriosis:Potential Role in Decidualization. Mol Hum Reprod, 2007; 13: 323–332.

(4)- Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Bbiati AA, Candiani M , Di Blasio A M. Analysis of the Codon 72 Polymorphism of the TP53 Gene in Patients with Endometriosis. Mol Hum Reprod, 2004; 10 (9):651–654.

(5)- Maleknejad P, Rakhshan M, Kazemi B. Detection of Human PapilomavirusTypes 16 and 18 in Pathologic Samples From Patients with Cervical Cancer by PCR and RFLP Methods. DARU, 2006; 14. (2): 78-81.

(6)- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses Associated with Human Cancer. Review. Biochimica et Biophysica Acta, 2008; 1782: 127–150.

(7)- Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, Treloar SA, Painter JN, Missmer SA, Kennedy SH, Zondervan KT. The Search for Genes Contributing to Endometriosis Risk. Hum Reprod Update, 2008; 14: 447–457.

(8)- Munger K, Howley PM. Human Papillomavirus Immortalization and Transformation Functions. Virus Res, 2002; 89:213–228.

(9)- Oppelt P, Renner SP, Strick R, Valletta D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Strissel PL. Correlation of high-risk Human Papilloma Viruses but not of Herpes Viruses or Chlamydia Trachomatis with Endometriosis Lesions. Fertil Steril (in press), 2009.

(10)- Paquete RL, Lee YY, Wilczynski SP. Mutations of p53 and Human Papillomavirus Infection in Cervical Carcinoma. Cancer, 1993; 72:1272–1280.

(11)- Prasad CJ, Sheets E, Selig AM, McArthur MC, Crum CP. The Binucleate Squamous Cell: Histologic Spectrum and Relationship to Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. Modern Pathology, 1993; 6 (3):313–317.

(12)- Prentice A, lecturer S. Endometriosis. Regular Review. BMJ, 2001; 323(7304): 93–95.

(13)- Ruth A, Lininger MPH, Wistuba I, Gazdar A, Koenig C, Fattaneh A, Jorge Albores-Saavedra J. Human Papillomavirus Type 16 Is Detected in Transitional Cell Carcinomas and Squamotransitional Cell Carcinomas of the Cervix and Endometrium. Cancer, 1998; 83 (3): 521-527.

(14)- Salem A. Dismissing Links between HPV and Aggressive Tongue Cancer in Young Patients. Ann Oncol , 2010; 21: 13–17.

(15)- Samboork J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning .2 nd.Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

(16)- Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P. High Rates of Autoimmune and Endocrine Disorders, Fibromyalgia, Chronic Fatigue Syndrome and A topic Diseases among Women with Endometriosis: a Survey Analysis. Hum Reprod , 2002; 17:2715–2724.

(17)- Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological Factors and Their Role in The Genesis and Development of Endometriosis. J Obstet Gynaecol Res, 2006; 32:162–170.

(18)- Vestergaard AL, Knudsen UB, Munk T, Rosbach H, Bialasiewicz S, Sloots TP, Martensen PM , Antonsson A. Low Prevalence of DNA Viruses in theHuman Endometrium and Endometriosis. Arch Virol, 2010; 155:695–703.

(19)- Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of Papillomaviruses. Virology, 2004; 324: 17–27.

(20)- Wu QJ, Guo M, Lu ZM, Li T, Qiao HZ, Ke Y. Detection of Human Papillomavirus-16 in Ovarian Malignancy. Br J

Cancer, 2003; 89(4): 672–675.
(18)- Yanga HJ, Liua VWS, Tsanga PCK, Yipa AMW, Nga TY, Cheungb A, Ngan HYS. Comparison of Human Papillomavirus DNA Levels in Gynecological Cancers: Implication for Cancer Development. Tumor Biology, 2003; 24 (6): 237-244.