

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



970/4



دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه  
دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه تخصص پزشکی رشته آسیب شناسی

عنوان:

بررسی میزان همراهی HPV 16,18 پروتئین P16 در بیماران دارای  
پاپ اسمیر دیسپلاستیک سرویکس (کرمانشاه، ۸۵-۱۳۸۴).

استاد راهنما:

دکتر بابک ایزدی

استادیار

اساتید مشاور:

دکتر محسن امامی آل آقا

استادیار

دکتر شهره ملک خسروی

استادیار

دکتر منصور رضایی

استادیار

نگارش:

دکتر سید قاسم میربهراری

فروردین ۱۳۸۶

۹۶۵۴۰

کتابخانه مرکزی دانشگاه کرمانشاه

۱۳۸۷ / ۲ / ۲

تقدیم به:

## استاد بابک ایزدی

معلم علم و اخلاق که همواره چراغ  
راهم بوده و خواهند بود.

## با تشکراز:

همکاران مرکز مولکولار پاتولوژی  
و خانم خزاعی که بسیار قدردان  
کمکهای ایشانم.

# چکیده

## مقدمه

سرطان گردن رحم دومین سرطان شایع در زنان می باشد و علت موفقیت در کشف زودرس آن تست پاپ اسمیر است که باعث کاهش مرگ و میر ناشی از این سرطان شده است. با این حال این تست دارای موارد منفی کاذب و مثبت کاذب نیز می باشد. اخیراً پروتئینی بنام P16 که یک مهار کننده Cyclin-CDKI (dependent Kinase) می باشد بعنوان مارکر دیسپلازی در سلولهای اپی تلیال مطرح شده است. این پروتئین در کانسر سرویکس بروز بیش از حد (Overexpression) پیدا می کند. در این مطالعه به ارتباط مارکر P16 و HPV16&18 با درجه دیسپلازی پرداخته ایم.

## مواد و روشها

از ۴۵ بیمار نمونه گیری بعمل آمد (یک نمونه سیتوبراش برای HPV و نمونه Liquid-base برای مارکر P16). بررسی برای HPV16&18 به روش PCR (Polymerase Chain Reaction) و برای مارکر P16 به روش ایمنو سیتوشیمی بر روی نمونه های Liquid-base انجام شد.

## نتایج و بحث:

در بررسی ایمنو سیتوشیمی برای مارکر P16 نتایج زیر حاصل شد:  
ASCUS(3/13,23%) LSIL(12/18,67%) HSIL(11/11,100%)  
S.C.C(3/3,100%) و نتیجه PCR برای HPV16 یا HPV18 به صورت زیر

بدست آوردیم: ASCUS(8/13 ,61/5%) ,LSIL(12/18 ,67%)  
(S.C.C(2/3 ,67%) ,HSIL(10/11,91%) در مطالعه ما افزایش درصد مثبت  
شدن مارکر P16 ارتباط معنی داری با افزایش درجه دیسپلازی در نمونه های  
پاپ اسمیر نشان داد(P<0/0001) اما این نتیجه در مورد HPV16&18 اینگونه  
نبود(P=0/253) ما پیشنهاد می کنیم از تست p16 بعنوان یک تست  
Optional(همراه) برای کشف دیسپلازی سرویکس استفاده شود.

**کلید واژه:** پاپ اسمیر، Liquid-base، پروتئین P16، HPV16,18

# ABSTRACT

## Background

Cervical (uterine) carcinoma is the second most frequent type of women cancer. Success in early diagnosis of this disease is due to the use of pap-smear test. However this test has both false-positive and false-negative results.

Recently, P16 protein detected in dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. P16 protein is a Cyclin-dependent Kinase inhibitor that overexpressed in cervical cancers. Our study is about correlation between HPV16/18 and P16 with cervical dysplasia.

## Material & methods

45 samples were taken (cytobrush specimens for HPV and Liquid-base specimens for P16). Detection of HPV16,18 and P16 by polymerase chain reaction (PCR) method and Immunocytochemical analysis respectively were performed on 45 samples.

## Results

Immunostaining of P16 protein was observed in: ASCUS(3/13,23%)LSIL(12/18 ,67%)HSIL(11/11,100%) and S.C.C(3/3 ,100%).

Specimens obtained from patients showed infection by HPV16 or HPV18 (by PCR ) in:

ASCUS(8/13,61.5%),LSIL(12/18,67%),

HSIL(10/11,91%),SCC(2/3,67%).

Our study show that P16 marker immunostaining has significant correlation with degree of cervical dysplasia in Liquid-base pap-smear ( $P < 0/0001$ ) but not for HPV16, 18( $P = 0/253$ ).

We suggest the use of P16-test as an optional test for cervical dysplasia.

## Key Word:

Pap-Smear , Liquid-base, Protein P16,HPV16,18

## فهرست مطالب

### عنوان شماره صفحه

#### فصل اول

۲	.....(۱)مقدمه:
۳	.....(۱-۱) کانسر سرویکس
۵-	.....(۱-۲) Human Papilloma Virus
۱۰	.....(۱-۲-۱) Classification
۱۱	.....(۱-۲-۱) Epidemiology اپیدمیولوژی
۱۴	.....(۱-۲-۳) Human Papilloma Virus تشخیص ویروس
۱۵	.....(۱-۳) P16INK4a
۱۸	.....(۱-۴) immunocytochemistry(ICC) ایمنوسیتوشیمی
۲۰	.....(۱-۴-۱) Detection سیستم های
	.....(۱-۴-۲) روش مستقیم آنتی بادی کونژوگه (Direct conjugate-Labeled Antibody Method)
۲۰	.....(۱-۴-۳) روش غیر مستقیم یا Sandwich
۲۲	.....(۱-۵) پاپ اسمیر Liquid-Based
۲۳	.....اهداف و فرضیات پایان نامه
۲۷	.....

#### فصل دوم

۳۱	.....(۲-۱) وسایل ،دستگاهها و کیتها و مواد شیمیایی مورد استفاده
۳۱	.....(۲-۱-۱) ابزار و دستگاهها
۳۲	.....(۲-۱-۲) مواد و ترکیبات شیمیایی
۳۳	.....(۲-۱-۳) کیت ها و رنگها
۳۴	.....(۲-۱-۴) بافر Lysis Buffer
۳۴	.....(۲-۱-۵) بافر (Tris-borate) 10X TE
۳۵	.....(۲-۱-۶) بافر TE



## فهرست مطالب

۳۶	..... برداشت نمونه ها (۲-۲)
۳۷	..... انجام آزمایشات (۲-۳)
۳۷	..... نمونه نگهداری شده در Liquid-base (۲-۳-۱)
۳۷	..... تهیه اسمیر لام (۲-۳-۱-۱)
۳۸	..... رنگ آمیزی پاپ نیکولائو (Papanicolaou, s Stain) (۲-۳-۱-۲)
	..... رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی ICC (۲-۳-۱-۳)
۳۹	..... (Immunocytochemical)= ..... نمونه نگهداری شده در PBS (۲-۳-۲)
۴۲	.....
۴۲	..... استخراج Total DNA (۲-۳-۲-۱)
۴۳	..... بررسی کیفیت DNA استخراج شده (۲-۳-۲-۱-۱)
۴۳	..... بررسی کمیت DNA استخراج شده (۲-۳-۲-۱-۲)
۴۴	..... آزمایش PCR (۲-۳-۲-۲)
۴۵	..... الکتروفورز (۲-۳-۲-۳)
	فصل سوم
۴۷	..... نتایج جمع آوری نمونه ها (۳-۱)
۴۸	..... نتایج نمونه های پاپ اسمیر Liquid-Base (۳-۲)
۵۴	..... نتایج Immunocytochemistry=ICC (۳-۳)
۵۸	..... نتایج استخراج DNA (۳-۴)
۶۳	..... نتایج آزمایش PCR (۳-۵)
۶۳	..... نتایج بررسی HPV16 (۳-۵-۱)
۶۳	..... نتایج بررسی HPV18 (۳-۵-۲)
۶۶	..... نتایج بررسی HPV16 و HPV18 (۳-۵-۳)
	فصل چهارم
۶۰	..... بررسی نتایج p16 (۴-۱)
۷۲	..... بررسی نتایج PCR (۴-۲)
۷۵	..... نتایج گزارش نمونه های پاپ اسمیر (۴-۳)
۷۷	..... پیشنهادات
۸۱	..... منابع

# فصل اول

## مقدمه

## ۱- مقدمه:

کanser سرویکس یکی از مهمترین بدخیمی های زنان (۱) و شایع ترین بدخیمی سیستم تناسلی خانم ها در بسیاری از کشور ها محسوب می شود. (۲) چند دهه پیش شایع ترین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ، در بسیاری از کشورها ی غربی این مسئله بوده است ولی با استفاده گسترده از pap-smear سیتولوژی در غربالگری خانم ها ، بطور موفقیت آمیزی کاهش در بروز کارسینوم مهاجم و کاهش شدید در مرگ ناشی از این kanser ایجاد شده است. (۳-۵)

در حال حاضر ۲۰۰۰۰۰ نفر در سال در اثر kanser سرویکس جان خود را از دست می دهند و سالانه حدود ۴۰۰۰۰۰ هزار مورد جدید از کارسینوم مهاجم تشخیص داده می شود (۴). ضمناً با توجه به افزایش موقعیت ها و مسائل پیش سرطانی (Precancerous) در جوامع و تغییر در رفتارهای اجتماعی و جنسی باز نگری بیشتری در شیوع و بروز این بیماری را می طلبد .

فهم پاتوژنز kanser سرویکال در شناخت عوامل دخیل و مراحل بیماری و استفاده از اسباب تشخیص بسیار مهم می باشد. در حال حاضر این مهم، از مطالعات Clinical، Molecular، Epidemiologic بدست آمده است.

مطالعات اپیدمیولوژیک مطرح کننده ویروسی است که از طریق جنسی منتقل می شود. (۳-۵) Human Papilloma Virus (HPV) مکرراً بعنوان یک فاکتور مهم در انکوژنز kanser سرویکس مطرح شده است. البته انواع خاصی از HPV مثل انواع ۱۶ و ۱۸، ارتباط قوی با kanser سرویکس را نشان میدهند. (1-6-7-8-9-10)

## ۱-۱ کانسر سرویکس

تقریباً تمام کارسینوم های مهاجم سرویکس یک مرحله از سلولهای غیر طبیعی که محدود به اپی تلیوم می باشد (intraepithelial.Stage) را طی می کنند. تفاوت های Morphologic بین مراحل مقدماتی کانسر سرویکس قابل کشف است (۱۱-۲) و این امکان را می دهد که از طریق سیتو لوژی این مراحل را از همدیگر افتراق دهیم. بین مراحل پیش سرطانی و دیسپلازی و کارسینوم سرویکس فاصله زمانی مناسبی وجود دارد بطوریکه حتی در ضایعات درجه بالای (High grade) دیسپلازی فاصله زمانی تا تبدیل شدن به کانسر مهاجم چندین ماه تا چندین سال طول می کشد. (۱۲-۱۳) این مدت زمان ارزش ویژه ای به اقدامات غربالگری و کشف ضایعات پیش سرطانی می دهد. با این مقدمه به توضیح مختصری در مورد انواع شایع کانسرهای سرویکس می پردازیم

## ۱-۱-۱ سرطان سلول سنگفرشی Squamous Cell Carcinoma

در بین کانسرهای سرویکس S.C.C شایع ترین کارسینوم سرویکس می باشد (۲-۵) و هنوز شایع ترین بدخیمی در سیستم تناسلی زنان محسوب می گردد. و حتی شایع ترین نئوپلاسم زنان در بعضی کشورها قلمداد می شود (۲-۴). احتمال وقوع این بیماری از دهه ۵۰ تا سنین کهنسالی وجود دارد ولی پیک سنی آن (البته در حال پایین آمدن می باشد) حدود ۴۰-۵۰ سالگی است که حدوداً یک دهه پیش از High grade CIN (Cervical Intraepithial Neoplasia) می باشد. (۵) در بررسی ماکروسکوپی

ممکن است توده ایی Polypoid یا انفیلتراتیو عمقی باشد و حتی از نظر بالینی می تواند نامشخص باشد. از نظر میکروسکوپی خود به سه دسته تقسیم می شود. البته هر چند می توان ترکیبی از اینها یا اشکال بینابینی را مشاهده نمود . عبارتند از:

1- Large Cell Keratinizing

2- Large Cell nonKeratinizing

3- Small Cell Type

انواع دیگر آن شامل:

Basal Cell Carcinoma, Spindl Cell Carcinoma, Verrucous

Carcinoma ,Lymphoepithelial-Like Carcinoma

از نظر مرحله بیماری (Stage) مراحل Microinvasive و Insitu نیز وجود دارد. (۱۳-۵-۲) در مرحله insitu سلولهای تومورال از غشای پایه رد نشده است. در مرحله Microinvasive عمق نفوذ به استروما در حدود ۵ mm یا کمتری باشد. (۲)

2-1-1 Adenocarcinoma:

این نوع ۱۰-۵٪ کارسینوم سرویکس را تشکیل می دهد. از نظر ماکروسکوپی مثل S.C.C است ولی کمی در سنین جوان تر رخ میدهد. در آدنوکارسینوم سرویکس

هم بنظر می رسد HPV نقش داشته باشد. هر چند نقش OCP در این نوع از کانسر مهم به نظر می رسد. (۵-۸-۱۳-۱۴-۱۵)

## ۱-۲ Human Papilloma Virus

همچنانکه قبلا اشاره شد مطالعات اپیدمیولوژیک نشان دهنده Risk Factor ی هستند که قادر به انتقال از طریق جنسی می باشد. اساس این مسئله ناشی از یافته هایی بود که در افراد مبتلا به کانسر سرویکس مشاهده می شود مانند:

-سن پایین ازدواج

-Multiple Sexual Partner-

-A male Partner With Multiple Previous Sexual Partners-

ریسک فاکتورهای دیگر مثل Multiparity، سطح اقتصادی پایین، مصرف OCP سیگار، سابقه خانوادگی نیز موثرند. (۱۱-۱۶-۱۷-۱۸)

از حدود ۲۵ سال پیش نقش HPV در کانسر سرویکس با مطالعات گسترده مورد توجه ویژه قرار گرفت. در سال ۱۹۹۵ یک Working group بین المللی که روی کانسر سرویکس کار می کردند نشان داد ندکه بعضی از انواع HPV (که انتقال Sexually دارند) در کارسینوم کانسر سرویکس مهم می باشند (۱۹-۲۰)

این ویروس های کوچک Nonenveloped DNA که آنها ۸-Kbp بصورت Closed circular Double-Stranded می باشد که بایک کپسید Icosahedral، 55nm (چند وجهی) پوشیده شده است. (۲)

اکثر HPV ها بر اساس گونه هایی که در آنها یافت شده اند (Origin) و شباهتهای ژنومی ویروس کلاس بندی شده اند. (۲۱)

ژنوم این ویروس به ۳ منطقه تقسیم می شود: منطقه LCR (A Long Control Region) که ۱۰٪ ژنوم را تشکیل می دهد و مناطق E (Early) و L (Late). ژنهای L پروتئین های ساختمانی را کد می کنند و منطقه E بیشتر عملکرد تکثیر DNA و فعال کردن سیکل زندگی ویروس را بر عهده دارد. ساختمان شماتیک ژنوم ویروس در شکل شماره ۱-۱ مشاهده می نماید. (۲-۳-۵)

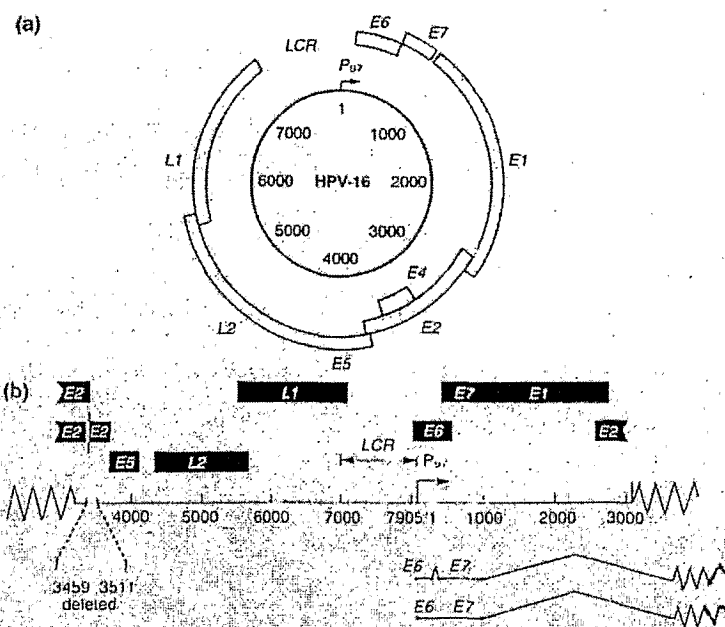


Fig. 1: (a) Circular map of HPV-16 genome. Early (E) and late (L) open reading frames as well as the long control region are indicated. Transcription occurs from one strand only in a clockwise direction. (b) Structure of the integrated HPV-16 DNA in the human cervical cancer cell line SiHa. Integration occurred within the E2 open reading frame. The structure of the transcripts is indicated. (modified from Huibregtse and Scheffner 1994.) Adapted from ref. 7.

## شکل شماره ۱-۱

E7, E6, E5 ژنهای کد کننده برای پروتئین های تحریک کننده رشد می باشند. در انواع خاص از اینها E7 و E6 در تبدیل به Malignancy دخالت می کند. E6 در بعضی از انواع HPV، با P53 تداخل عمل (Interaction) پیدا می کند و باعث تخریب سریع P53 می گردد. (۳-۵)

E7 نیز در همان انواع قادر است یک کمپلکس با تومور ساپرسور پروتئین RB ایجاد نماید و باعث آزاد شدن Cellular Transcription Factor از اتصال با RB و فعال شدن چرخه تکثیر سلولی می گردد. (شکل شماره ۲-۱)

ژن E1، RNA پلی سیسترونیک (Polycistronic) را کد می کند و در تکثیر DNA ویروس دخالت می کند. E2 نیز به همین ترتیب عمل می نماید.

و علاوه بر آن تنظیم تکثیر ژنوم HPV را از قسمت LCR توسط ایجاد Dimerهایی در مناطق اتصالی خاص، بر عهده دارد.

E4 بنظر می آید اشتباها جزئی تولیدات ژنوم Early به حساب آمده است. E4 در بلوغ ویروس و آزاد شدن Particle و ایجاد شبکه Cytoplasmic که همراهی با فیلامانهای سیتو کراتین دارد شرکت می کند.

پروتئین های L1 و L2 جزئی بخش های Capsid هستند و L1 بخش اصلی آن میباشد. (۱۰) نمایی تکثیر mRNA این ویروس و وضعیت فیزیکی DNA در ضایعات Benign مثل آنچه در زگیل های تناسلی (Condylomaها) و یا پاپیلوم های خوش خیم می بینیم متفاوت از آنچه است که در دیسپلازی High grade و Carcinoma مشاهده می شود.



در کوندیلوما، پاپیلوما و دیسپلازی Low grade، DNA ویروس بصورت Nonintegrated nuclear episom ویروس با سطوح مختلف ژنهای ویروس را نشان می دهد و در بین آنها E4، E5 خیلی فراوان تر می باشد. پروتئین کپسید (Capsid) ویروس ممکن است در بعضی سلولهای تمایز یافته قابل بررسی و مشاهده باشد. (۲۲)

بر خلاف آن در کارسینوم درجا (Carcinoma in situ) و کانسر مهاجم ویروس محصولات تولیدی زیادی ندارد. در عوض DNA ویروس اغلب وارد (Integrate) کروموزوم میزبان شده و البته توالی های خاصی از ژنوم ویروس نیز از دست رفته است. Viral Copy number بطور مشخص کاهش یافته و قدرت تکثیری زیادی ندارد. چرا که این Integration نظم واحدهای تکثیری ویروس را بر هم زده و بسیاری از ژنهای HPV باز نمی شوند. اگرچه mRNA ی E7 و E6 سطوح بالاتری در این ضایعات کانسری دارند و این در حالی است که در سلولهای مجاور که از نظر هیستولوژی نرمال هستند تفاوت وجود دارد. این یافته ها، در مورد عملکرد E7 و E6، مدارک کانسر زایی HPV را بیشتر مشخص می کند (۱۸).

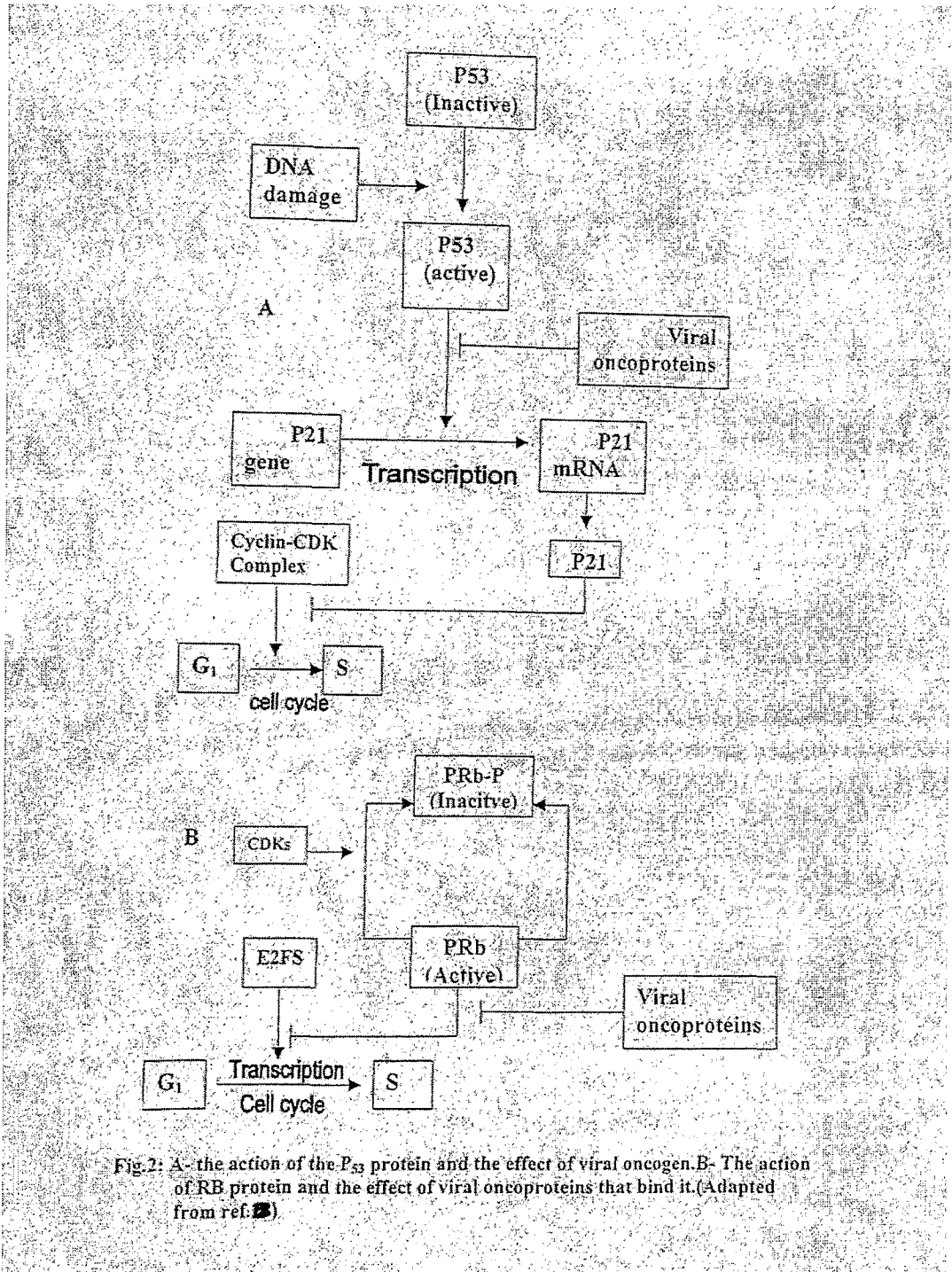


Fig. 2: A- the action of the P<sub>53</sub> protein and the effect of viral oncogen. B- The action of RB protein and the effect of viral oncoproteins that bind it. (Adapted from ref. [3]).

شکل شماره ۲-۱

## Classification 1-2-1

بیش از ۱۰۰ ژنوتیپ مختلف از HPV امروزه مشخص شده است که در حدود ۴۰ تیپ آن در موکوس منطقه مقعدی-جنسی (Anogenital) قابل کشف می باشد. (۱۹-۶). تقسیم بندی HPV ژنیتال به سه گروه که از نظر Pathogenicity مختلف می باشد به قرار زیر است:

-انواع 6, 11, 42, 43, 44 ویروس که اکثراً در ضایعات خوش خیم مثل کوندیلوما دیده می شوند و به اینها گروه Low.Risk می گویند.

-انواع ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۵۱، ۵۲، ۵۸ که این گروه در Low.grade CIN یا LSIL دیده می شوند و به اینها گروه Intermediate Risk اطلاق می گردد.

-گروه 16, 18, 45, 56 که در HSIL و کارسینوم مهاجم یافت می گردد و گروه High.Risk هستند. (-۱۳-۱۵-۱۶-۲۲-۱۹-۲۱)

در تقسیم بندی دیگری به دو گروه زیر تقسیم می شوند:

44,42, 11, 6: Low.Risk.Group-

58, 56, 52, 51, 45, 39, 35, 35, 33, 31, 18, 16: High.Risk.group-

68, به گروه High.Risk گروه Cancer-associated نیز اطلاق می شود. در بین

این گروه انواع 16, 18 شایع ترین هستند (۱-۲-۱۹-۲۲)

## ۱-۲-۲ اپیدمیولوژی Epidemiology

شیوع HPV بر اساس جمعیت مورد مطالعه و حساسیت روش بررسی جمعیت مورد مطالعه و حساسیت روش بررسی (Detection) این ویروس مختلف می باشد. بیشترین شیوع در زنان 15-25 ساله است و با افزایش سن، این شیوع کمتر می شود. (۲۰-۲۲-۲۳) تصویر شماره ۱-۳.

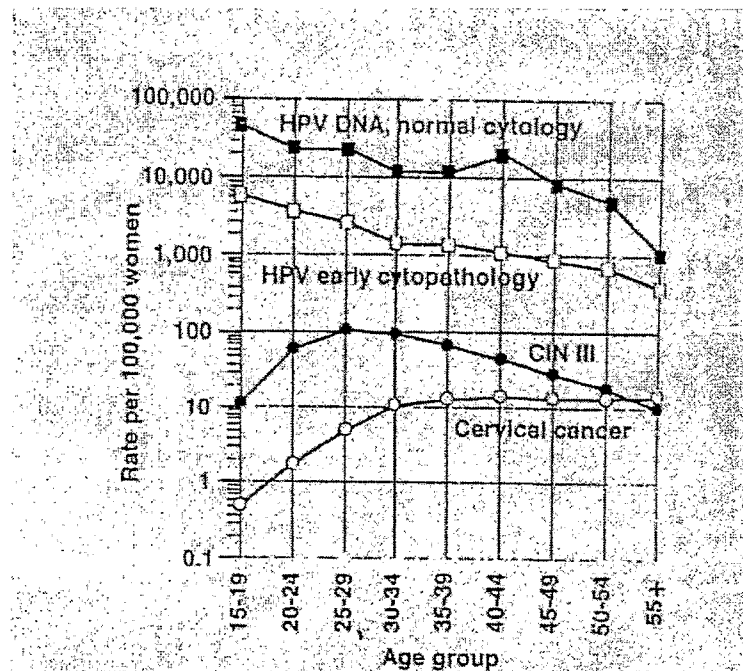


FIG. 8. Age-specific rates of cervical HPV infection and associated abnormalities. HPV infection with normal cytology is much more common than HPV infection associated with abnormal cervical cytology. The prevalence of HPV infection decreases with age. Peak incidence of cervical intraepithelial neoplasia type III (CIN III) develops in women who are older than those with the highest rates of HPV infection. Peak incidence of cervical cancer develops in women who are older than those with the highest rates of CIN III. HPV DNA with normal cytology and early cytopathology are point-prevalence data, whereas the CIN III and cervical cancer data are incidence rates. The data are from several sources in the United States. (Adapted from ref. 25)

شکل شماره ۱-۳