

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

١٥٩٣٤١ - ٢٠١٥٧١٤



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی - میکروبیولوژی

شناسایی ویروس پاپیلوما‌ی انسانی در تومور گردن رحم و سرویسیت به وسیله Nested-PCR

استاد راهنما:

دکتر مجید بودری

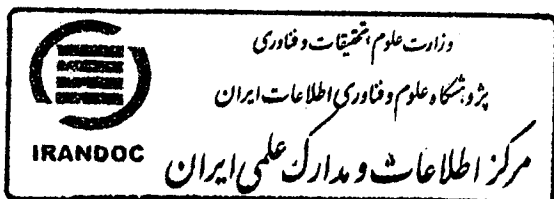
استاد مشاور

دکتر اردشیر طالبی

پژوهشگر:

الهه میرزایی کاشانی

آبان ماه ۱۳۸۸.



۱۵۹۳۴۱

۱۳۹۰/۳/۲۲

شبهه نگارش پایان نامه
رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی - میکروبیولوژی تحت عنوان

شناسایی ویروس پاپیلوما‌ی انسانی در تومور گردن رحم و سرویسیت به وسیله Nested-PCR

در تاریخ ۱۳۸۸/۸/۲۷ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر مجید بودری با مرتبه‌ی علمی استاد یار

امضا

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر اردشیر طالبی با مرتبه‌ی علمی دانشیار

امضا

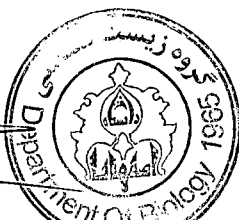
۳- استاد داور داخل گروه دکتر سید حمید زرکش با مرتبه‌ی علمی استاد یار

امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر محمد رضا محزونیه با مرتبه‌ی علمی دانشیار

امضا

امضای مدیر گروه



کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

خدایا پیشانی بر خاک تو می گذارم چون سجده سزاوار بزرگی و عظمت توست . تو مالک جان و تن بندگانی و همه حقایق را می دانی و هر آنچه بخواهی روا می داری . ابد و ازل از توست و چراغ هر دانش و معرفتی از تو روشن است. بر من سعادت شناخت بندگی عنایت فرما چون اصل کائناتی و من ذره ای از حیات . تو در عالم غیبی و بندگانت پر از عیب ، عیوبم را بنمایان تا در رفع آنها کوشا باشم.

در این سالها هیچ تلاشی نکردم مگر به لطف و رحمتت و هیچ توشه‌ای به دست نیاوردم مگر به اراده تو و از تو می خواهم در ادامه راه یاریگرم باشی تا دینی که بر گردن دارم آنچنان که خوشایند توست ادا کنم.

شایسته است مراتب سپاسگزاری خود تقدیم استاد ارجمندم جناب آقای دکتر بوذری که در اخلاق سرمشق بنده بودند کنم. از استاد مشاورم جناب آقای دکتر طالبی به خاطر زحماتشان تشکر می کنم و همچنین از خواهران و برادران به خاطر همراهی و همدلیشان سپاسگزارم.

از اساتید داور داخل و خارج که زحمت داوری پایان نامه این حقیر را بر عهده گرفتند کمال تشکر را دارم.

از تمام اساتید دانشکده و تمامی هم کلاسیه‌هایم تشکر می کنم و برایشان آرزوی سلامتی و موفقیت دارم.

در پایان از کلیه کارکنان بیمارستان الزهرا که در تهیه نمونه این حقیر را یاری رساندند سپاسگزاری می کنم.

خدایا! ایمانی به من عطا کن تا دریابم گرچه عزیزی از دست داده‌ام، اما هنوز تو با منی و این تنها چیزیست که بدان نیازمندم.

خدایه! در کنارم بمان!

تقدیم به کهکشان عشق و مهربانی

مادرم

تقدیم به صدای دلتنواز ساز زندگی

همسرم

و

تقدیم به ضربان قلبم

دخترم

(خوب گوش کردن را خوب بیاموزیم گاه فرصتها بسیار آهسته در میزنند)

چکیده:

پاپیلوما ویروس ها در همه جا هستند و واریته های وسیعی از آنها همانند انسانها در حیوانات مشخص شده اند که برای میزان های مربوطه شان خاص هستند. بیش از ۲۰۰ نوع HPV بر پایه اطلاعات توالی DNA شان شناسایی شده اند که نشان دهنده تفاوت ژنومی است. ۸۵ ژنوتایپ از HPV به خوبی شناسایی شده اند، بعلاوه ۱۲۰ تا از جدایه ها به عنوان ژنوتایپ های جدید شناسایی شده اند. پاپیلوما ویروس ها می توانند سلول های پوست یا لایه های داخل بافتی را آلوده کنند که بر این اساس به انواع پوستی و مخاطی طبقه بندی می شوند. انواع پوستی، اپیدرم دوست هستند (اپیدرموتروفیک) و پوست دست ها و پاها را مورد هدف قرار می دهند. و انواع موکوسی لایه های دهان، گلو، لوله های تنفسی یا اپی تلیوم دستگاه تناسلی را آلوده می کنند. بر اساس ارتباط شان با سرطان گردن رحم و جراحات قبل از آن HPV ها به انواع پرخطر و کم خطر نیز طبقه بندی شده اند. انواع HPV های کم خطر شامل تیپ های ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳ و ۴۴ هستند و انواع پرخطر شامل تیپ های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۸ و ۷۰ هستند. گروه پرخطر تعدادی از انواع HPV که کمتر بطور مکرر در سرطان پیدا می شوند و اغلب در زخم های اینتراپیتلیال سنگفرشی دیده می شوند را در بر می گیرد. تعدادی مقالات این نوع HPV ها را با خطر متوسط معرفی می کنند. ساب تایپ های کم خطر گه گاه در سرطان های رحم پیدا شده اند. آگاهی از ارتباط HPV با سرطان رحم خیلی زودتر آغاز شده بود. در ۱۹۸۱، زور هاوسن و همکاران گزارش شناسایی HPV DNA را در نئوپلازیا رحمی ارائه دادند. سرطان رحم، هنوز هم زنان سر جهان را درگیر می کند و هنوز به صورت یک کانون اصلی تحقیقات برای محققان باقی مانده است. التهاب های گردن رحم اغلب بوسیله عفونت ایجاد می شوند بیماری های انتقال یافته از طریق جنسی که می توانند باعث التهاب گردن رحم شوند شامل: کلامیدیا و گنوره. هرپس ویروس (هرپس تناسلی) و تریکوموناسیس ممکن است باعث اکتوسروسیت شوند. HPV هم عامل دیگری است که باعث التهاب گردن رحم می شود. این مطالعه هدف دارد که میزان عفونت با HPV را در نمونه های توموری گردن رحم و التهاب گردن رحم مزمن در جمعیت اصفهان ارزیابی کند.

صد و بیست و دو نمونه بافت فرمالینه جاسازی شده در پارافین (۷۹ نمونه از التهاب گردن رحم و ۴۳ نمونه از تومور گردن رحم) که از نظر تغییرات هیستوپاتولوژیکی آزمایش شده بودند از فایل هیستوپاتولوژی بیمارستان الزهرا در اصفهان جمع آوری شدند. بلوک ها برش داده شدند و ۱۰ قطعه با ضخامت ۴ میکرومتر جمع آوری شدند. نمونه ها توسط گزین پارافین زدایی شدند و سپس DNA ویروس توسط فنل / کلروفرم / ایزوآمیل الکل استخراج شد. پلت تشکیل شده خشک شد و دوباره در آب دوبار تقطیر یا محلول TE بعد از رسوب با اتانول حل شد. DNA های استخراج شده در معرض PCR آشیانه ای با استفاده از پرایمرهای جامع MY09/MY11 و GP5+/GP6+ که برای تکثیر ناحیه حفاظت شده ژنوم که پروتئین L1 را کد می کند، طراحی شده اند قرار گرفتند. اطلاعاتی که در مورد تغییرات هیستوپاتولوژیکی جمع آوری شده بود بوسیله مقاطع رنگ آمیزی شده با اتوزین و هماتوکسیلین دوباره مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از PCR آشیانه ای 10µl از محصول PCR راند دوم در ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم برمایند لود می شود و الکتروفورز می شود. در بررسی های آماری نرم افزارهای

GraphPad و SPSS استفاده شد. ۴ محصول PCR به صورت تصادفی از ۲ گروه مورد بررسی انتخاب و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت GeneService فرستاده شد. ردیف کردن توالی‌های متعدد با استفاده Clustal W در نرم-افزار MEGA انجام شد. شماره دسترسی‌های (GQ179958)، (GQ179959)، (GQ452049) و (GQ452050) در بانک ژن ثبت گردید.

در تحقیق حاضر نیز دو نمونه SCC با تشخیص پاتولوژی مورد آزمایش قرار گرفت و آلودگی به HPV مشاهده نشد. البته به دلیل آن که تعداد نمونه SCC کم بود نمی‌توان نتیجه‌گیری کرد که آیا HPV در این تومور نقش داشته یا نداشته است ولی می‌توان نتیجه گرفت که میزان SCC در ایران کمتر است. هم‌چنین ۲۱ نمونه Adenocarcinoma و ۲۰ نمونه CIN مورد آزمایش قرار گرفتند و ۲۳/۸٪ از Adenocarcinoma‌ها و ۴۰٪ از CIN‌ها آلوده به HPV بودند که این نتایج نسبت به آنچه در گزارشات دیگر محققین آمده میزان شیوع کمتری را نشان می‌دهد که می‌تواند ناشی از دخیل بودن عوامل خطر دیگر در کشورهای دیگر باشد که بعضاً در جمعیت ایران ناشناخته است. در تحقیق حاضر میزان شیوع در نمونه‌های التهاب گردن رحم ۹۸/۷٪ به دست آمد که این مغایرت می‌تواند ناشی از دخیل بودن یک سری عوامل دیگر در ایران باشد که هنوز ناشناخته‌اند.

کلمات کلیدی: HPV، التهاب گردن رحم، تومور گردن رحم، رحم، PCR آشیانه‌ای

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱	مقدمه
۲-۱-۱	آناتومی گردن رحم
۱-۲-۱	گردن رحم
۳-۱	ویروس شناسی پایه
۱-۳-۱	خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویروس های خانواده پاپیلوماویریده
۲-۳-۱	پاپیلوما ویروس انسانی
۳-۳-۱	طبقه بندی پاپیلوما ویروس ها
۴-۱	ژنوم HPV
۵-۱	آنکو پروتئین های HPV
۶-۱	چرخه سلولی HPV :
۱-۶-۱	اتصال ویروس به سطح سلول میزبان :
۲-۶-۱	ورود ویروس به داخل سلول میزبان :
۳-۶-۱	نگهداری ژنوم
۴-۶-۱	مرحله ی تکثیر
۵-۶-۱	سنتز ویروس
۶-۶-۱	خروج ویروس
۷-۱	اپیدمیولوژی
۸-۱	ظهور کلنیکی عفونت های منتقل شده از طریق جنسی
۹-۱	بیماری زایی
۱۰-۱	تشخیص
۱-۱۰-۱	سیتولوژی متداول
۲-۱۰-۱	هیستوپاتولوژی
۱۱-۱	درمان
۱۲-۱	پیشگیری
۱۳-۱	التهاب گردن رحم
۱-۱۳-۱	عوامل

عنوان	صفحه
۲-۱۳-۱- خطر ها	۴۱
۳-۱۳-۱- علائم	۴۱
۴-۱۳-۱- آزمایش های بالینی و آزمایشگاهی	۴۲
۱-۴-۱۳-۱- آزمایش های آزمایشگاهی	۴۲
۵-۱۳-۱- درمان	۴۲
۶-۱۳-۱- پیشگیری	۴۳
۱۴-۱- شناسایی DNA ویروس HPV	۴۳
۱-۱۴-۱- PCR خاص تیپ:	۴۳
۲-۱۴-۱- پرایمرهای عمومی PCR	۴۳
۳-۱۴-۱- هیبریداسیون مایع:	۴۵
۴-۱۴-۱- شناسایی mRNA HPV:	۴۷
۱۵-۱- تذکرات آخر و دستور و مسیر آینده	۴۷
اهداف تحقیق	۴۸

فصل دوم: مواد و روش ها

۱-۲- مواد و وسایل به کار رفته	۴۹
۱-۱-۲- وسایل مورد استفاده	۴۹
۲-۱-۲- وسایل پلاستیکی :	۵۰
۳-۱-۲- مواد به کار رفته	۵۰
۲-۲- مواد مورد استفاده برای انجام PCR	۵۱
۱-۲-۲- محلول ها و بافرهای مورد استفاده برای PCR:	۵۱
۲-۲-۲- پرایمرها	۵۲
۳-۲- DNA مشخص کننده سائز	۵۲
۴-۲- روش تهیهی محلول ها :	۵۳
۱-۴-۲- طرز تهیهی EDTA	۵۳
۲-۴-۲- طرز تهیهی Tris-Base :	۵۳
۳-۴-۲- محلول TBE :	۵۴
۴-۴-۲- محلول Tris-Base- EDTA (TE) :	۵۴

عنوان	صفحه
۵-۴-۲- روش تهیه ی محلول اتیدیوم بروماید.....	۵۴
۶-۴-۲- تهیه ی محلول بافر لیزکننده.....	۵۵
۷-۴-۲- پروتئیناز K.....	۵۵
۸-۴-۲- تهیه ی محلول فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل (PCI)	۵۵
۵-۲- روش کار.....	۵۵
۱-۵-۲- برش و آماده سازی بافت ها.....	۵۵
۲-۵-۲- روش استخراج DNA از بلوک های پارافینی	۵۶
۱-۲-۵-۲- زدودن پارافین از بافت ها	۵۶
۲-۲-۵-۲- استخراج DNA با فنل - کلروفرم.....	۵۷
۳-۲-۵-۲- استخراج DNA بدون استفاده از فنل کلروفرم.....	۵۸
۶-۲- تعیین خلوص DNA استخراج شده، جذب DNA استخراج شده.....	۵۹
۷-۲- رقیق کردن پرایمرها.....	۵۹
۸-۲- انجام Nested-PCR برای مارکرها ی موردنظر.....	۶۰
۱-۸-۲- غلظت مواد مورد استفاده در PCR اولی و دومی	۶۰
۲-۸-۲- برنامه ی Nested-PCR	۶۱
۹-۲- بررسی محصول PCR.....	۶۲
۱-۹-۲- تهیه ژل آگارز.....	۶۳
۲-۹-۲- انتقال محصول PCR به ژل.....	۶۳
۱۰-۲- استخراج DNA از ژل.....	۶۴
۱-۱۰-۲- مواد لازم برای خالص سازی نمونه های DNA از ژل.....	۶۴
۱-۱-۱۰-۲- طرز تهیه بافر شستشو.....	۶۴
۲-۱۰-۲- روش استخراج و خالص سازی DNA از ژل.....	۶۵
۱۱-۲- تعیین توالی نوکلئوتیدی	۶۶
۱۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری.....	۶۶

فصل سوم: نتایج

۶۷	۱-۳-مشخصات و اطلاعات مربوط به نمونه‌ها.....
۷۴	۲-۳- نتایج بررسی پاتولوژیکی نمونه‌ها.....
۷۴	۱-۲-۳- نتایج مشاهدات پاتولوژی.....
۷۴	۲-۲-۳- نتایج آزمایش نمونه‌های نئوپلاسم بدخیم.....
۷۴	۱-۲-۲-۳- نتایج آزمایش نمونه‌های CIN.....
۷۵	۲-۲-۲-۳- نتایج آزمایش در نمونه‌های آدنوکارسینوما.....
۷۶	۳-۲-۲-۳- نتایج آزمایش در نمونه‌های کارسینومای سلول‌های سنگفرشی.....
۷۷	۳-۲-۳- نتایج آزمایش در نمونه‌های بدون بدخیمی.....
۷۸	۳-۳- نتایج مراحل مختلف آماده‌سازی بافت.....
۷۹	۴-۳- نتایج حاصل از استخراج DNA.....
	۵-۳- نتایج Nested - PCR با پرایمرهای جامع My09 / My11 و پرایمرهای راند دوم
۸۰	GP5+/GP6+.....
۸۰	۱-۵-۳- تهیه کنترل مثبت PCR.....
۸۱	۲-۵-۳- نتایج Nested - PCR نمونه‌های انتخاب شده.....
۸۵	۶-۳- نتایج حاصل از تعیین توالی و آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی.....

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۹۲	۱-۴- بررسی روش استخراج DNA.....
۹۴	۲-۴- بررسی حساسیت پرایمرها.....
۹۵	۳-۴- ارتباط بین عفونت HPV و گسترش تومور.....
۹۷	۴-۴- نتیجه‌گیری کلی.....
۹۸	۵-۴- پیشنهادات.....
۹۹	پیوست.....
۱۱۴	منابع و ماخذ.....

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل (۱-۱) اجزای مختلف دستگاه تناسلی زنان	۶
شکل (۲-۱) ساختار نوکلئوکپسید پاپیلوماویروس انسانی که از ۷۲ کپسومر تشکیل شده است	۹
شکل (۳-۱) درخت فیلوژنیک پاپیلوماویروس بر اساس شباهت نوکلئوتیدی قسمتی از ناحیه L1	۱۲
شکل (۴-۱) نقشه ژنوم HPV که شامل ۸ عدد ژن غیر ساختاری و ۲ عدد ژن ساختاری است	۱۴
شکل (۵-۱) ژن های E6 و E7 HPV پروتئین های چند عملکردی کد می کنند که بطور اولیه به پروتئین های سلولی p53 و pRB باند می شوند، عملکردشان را قطع می کند و راه های تنظیم سیکل سلولی را تغییر می دهند و منجر به ترانسفورمیشن سلولی می شود	۱۶
شکل (۶-۱) مکانیسم عمل پروتئین E7 پاپیلوما ویروس که با اتصال به RB باعث آزاد شدن E2F می شود	۱۷
شکل (۷-۱) اتصال کمپلکس E6-Ub به p53 و تخریب آن و در نتیجه مهار آپوپتوزیز	۱۸
شکل (۸-۱) دگرگون شدن سلول ها توسط پاپیلوما ویروس های تیپ ۱۶ و ۱۸	۱۹
شکل (۹-۱) چرخه سلولی HPV 16	۲۰
شکل (۱۰-۱) مراحل مختلف تمایز سلول آلوده و بیان پروتئین های ویروسی در هر مرحله	۲۳
شکل (۱۱-۱) تشخیص عفونت HPV با توجه به علائم هیستوپاتولوژی	۲۵
شکل (۱۲-۱) آزمایش پاپ اسمیر با سلولهای سنگفرشی غیر نرمال تحت تاثیر HPV	۳۴
شکل (۱۳-۱) مونتاژ پارتیکل های شبه ویروسی HPV	۳۹
شکل (۱۴-۱) نمای سیتولوژی از التهاب گردنه رحم (سرویسیت)	۳۹
شکل (۱۵-۱) ژنوم HPV و مکان های اثر ست های پرایمری MY و GP+	۴۵
شکل (۱-۲) مارکر 100 bp مورد استفاده در ژل الکتروفورز، (Fermentas Germany)	۵۳
شکل (۱-۳) درجات مختلف CIN	۷۴
شکل (۲-۳) نمای هیستوپاتولوژیک آدنوکارسینوما بافت سرویکس با بزرگ نمایی ۱۰	۷۶
شکل (۳-۳) سلول های اپی تلیوم سنگفرشی آلوده به HPV DNA	۷۷
شکل (۴-۳) ارتشاح تعدادی سلول التهابی مزمن از نوع لنفوسیت در بافت همبندی. بافت پوششی اندوسرویکس دارای متاپلازی و تبدیل به بافت پوششی سنگفرشی و فاقد علائم بدخیمی است. تصویر میکروسکوپی سمت راست با بزرگنمایی ۱۰ مربوط به نمونه سرویسیت شماره ۱۰۹۹،۳ و تصویر میکروسکوپی سمت چپ با بزرگنمایی ۱۰ مربوط به نمونه سرویسیت شماره ۳۶۷۴،۳ می باشد	۷۸

- شکل ۳-۵) ژل الکتروفورز DNA استخراج شده از دو روش پرافین زدایی. روش A: دمای انکوباسیون ۵۹ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۱۵ دقیقه و سه بار تکرار. روش B: دما ۵۵ درجه و مدت زمان ۱۰ دقیقه و سه بار تکرار..... ۷۹
- شکل ۳-۶) نتایج خالص سازی DNA..... ۸۰
- شکل ۳-۷) نمونه‌های PCR شده برای تهیه کنترل مثبت..... ۸۱
- شکل ۳-۸) تصاویر میکروسکوپی ردیف بالا با بزرگنمایی ۱۰ مربوط به نمونه شماره ۲، ۴۸۵۰ می‌باشد که شکل A آن مربوط به ناحیه بدخیمی باضایعه Adenocarcinoma است و شکل‌های B و C به ترتیب مربوط به اپی‌تلیوم غددی و اپی‌تلیوم فلسی و فاقد بدخیمی می‌باشد..... ۸۳
- شکل ۳-۹) نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه‌های بدخیمی..... ۸۴
- شکل ۳-۱۰) نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه‌های سروسیست..... ۸۵
- شکل ۳-۱۱) توالی نوکلئوتیدی شماره‌های دسترسی (EL1, (GQ179958), EL2, (GQ179959), M3-MF, (GQ452049) و M49-MF, (GQ452050)..... ۸۶
- شکل ۳-۱۲) ردیف شدن توالی‌ها با شماره‌های دسترسی (EL1-RL1, (GQ179958), EL2-RL2, (GQ179959), M3-MF, (GQ452049), M49-MF, (GQ452050) با توالی اصلی به شماره دسترسی HPV o6JAN, (EU911303)..... ۹۲

فهرست جدول ها

صفحه	عنوان
۳	جدول ۱-۱ نوع HPV و بیماری‌های مربوطه
۵۲	جدول ۱-۲ نام پرایمرها و توالی آن‌ها
۶۰	جدول ۲-۲ غلظت مواد مورد استفاده در PCR راند اول با پرایمرهای MY09/MY11 (پرایمرهای جامع)
۶۱	جدول ۳-۲ غلظت مواد مورد استفاده در PCR دور دوم با پرایمرهای GP5+,GP6+
۶۲	جدول ۴-۲ برنامه‌ی PCR برای پرایمرهای MY09/MY11 (پرایمرهای جامع) و پرایمرهای GP5+/GP6+ به ترتیب
۶۸	جدول ۱-۳ مشخصات مربوط به سن، و تشخیص اولیه بیماران در نمونه‌های توموری
۷۰	جدول ۲-۳ مشخصات مربوط به سن، و تشخیص اولیه بیماران در نمونه‌های سرویسیت
۸۲	جدول ۳-۳ نمونه‌های توموری و سرویسیت و نتایج حاصل از PCR
۸۲	جدول ۴-۳ فراوانی HPV در نمونه‌های توموری و التهاب‌های گردن رحم
۸۳	جدول ۵-۳ میزان باند در نمونه‌هایی که یک بلوک دارای بدخیمی و یک بلوک فاقد بدخیمی بودند
۸۷	جدول ۶-۳ مقایسه توالی نوکلئوتیدی ۴ جدایی‌ی HPV به‌دست آمده از افراد سرطان گردن رحم و التهاب گردن رحم. Sequence 1(EL1-R (GQ799958), Sequence 2 (EL2-R (GQ799959), Sequence 4 (M3-MF (GQ452049) و Sequence 4 (M49-MF (GQ452050)
۸۸	جدول ۷-۳ میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های مختلف HPV با توالی نوکلئوتیدی نمونه شماره (EL1, GQ179958) با استفاده از جستجوی WU-BLAST2 در محیط EMBL
۸۹	جدول ۸-۳ میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های مختلف HPV با توالی نوکلئوتیدی نمونه شماره (EL2, GQ179959) با استفاده از جستجوی WU-BLAST2 در محیط EMBL
۹۰	جدول ۹-۳ میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های مختلف HPV با توالی نوکلئوتیدی نمونه شماره (M3-MF, (GQ452049) با استفاده از جستجوی WU-BLAST2 در محیط EMBL
۹۱	جدول ۱۰-۳ میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های مختلف HPV با توالی نوکلئوتیدی نمونه شماره (M49-MF, (GQ452050) با استفاده از جستجوی WU-BLAST2 در محیط EMBL

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV^۱) یکی از معمول‌ترین موارد بیماری‌هایی است که در زنان و مردان جهان از راه روابط جنسی منتقل می‌شود (Burd et al., 2003).

پاپیلوما ویروس‌ها در همه جا هستند و همانند انسان وارثه‌های زیادی از آن در میزبان‌های مختلف به صورت اختصاصی وجود دارند. بیش از ۲۰۰ نوع HPV بر پایه اطلاعات توالی DNA آنها شناسایی شده‌اند که نشان دهنده تفاوت ژنومی است. هشتاد و پنج ژنوتایپ از HPV به خوبی شناسایی شده‌اند، بعلاوه ۱۲۰ جدایه به عنوان ژنوتایپ‌های جدید شناسایی شده‌اند (Burd et al., 2003).

ویروس‌های پاپیلومای انسانی می‌توانند بافت پوششی پایه‌ای پوست یا لایه‌های داخلی بافتی را آلوده کنند که بر این اساس به انواع پوستی^۱ و مخاطی^۲ طبقه‌بندی شده‌اند. انواع پوستی، اپیدرم دوست هستند (اپیدرموتروفیک) و پوست دست‌ها و پاها را مورد هدف قرار می‌دهند و انواع مخاطی مخاط دهان، گلو، مجاری تنفسی یا بافت پوششی دستگاه تناسلی را آلوده می‌کنند (Burd et al., 2003; Cricca et al., 2004; Remmerbach et al., 2004).

بر اساس ارتباط شان با سرطان گردن رحم^۳ و جراحات قبل از آن HPVها به انواع پرخطر و کم‌خطر نیز طبقه‌بندی شده‌اند. انواع HPVهای کم‌خطر شامل تیپ‌های ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳ و ۴۴ هستند و انواع پرخطر شامل تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۸ و ۷۰ هستند (Burd et al., 2003; Motoyama et al., 2005; Mahdavi et al., 2004). گروه پرخطر تعدادی از انواع HPV که کمتر بطور مکرر در سرطان پیدا می‌شوند و اغلب در جراحات اینتراپیتلیال سنگفرشی^۴ دیده می‌شوند را در بر می‌گیرد (جدول ۱-۱). تعدادی از محققین این نوع HPVها را با خطر متوسط معرفی می‌کنند (Burd et al., 2003). ساب‌تیپ‌های کم‌خطر که گاه در سرطان‌های رحم پیدا شده‌اند. اغلب عفونت‌های HPV خوش‌خیم هستند. HPV در ابتدا به‌عنوان عامل زگیل‌های پوستی^۵ در دست و پا شناسایی شدند (زگیل‌های مسطح^۶، زگیل‌های معمولی^۷، زگیل‌های کف پا^۸). زگیل‌ها نواحی از پوست هستند که دچار افزایش حجم شده‌اند و میزان کراتین آن‌ها بالا است و به‌طور معمول در طی ۱ تا ۵ سال از بین می‌روند. تیپ‌هایی که صورت را مورد هدف قرار می‌دهند به احتمال زیاد سرطان پوست ایجاد می‌کنند. دیگر تیپ‌هایی که به‌طور اولیه در مخاط دهان رشد می‌کنند تولید ندول‌های برآمده کوچک می‌کنند که می‌توانند به طرف سرطان‌های سلولی سنگفرشی مهلک پیشرفت کنند.

-
1. Cutaneous
 2. Mucosal
 3. Cervical cancer
 4. Squamous intraepithelial lesions
 5. Cutaneous warts
 6. Flat warts
 7. Common warts
 8. Plantar warts

جدول (۱-۱) نوع HPV و بیماری‌های مربوط به آن‌ها

Disease	HPV type ^b
Plantar warts	1, 2, 4, 63
Common warts	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Flat warts	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Other cutaneous lesions (e.g., epidermoid cysts, laryngeal carcinoma)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodysplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Recurrent respiratory papillomatosis	6, 11
Focal epithelial hyperplasia of Heck	13, 32
Conjunctival papillomas/carcinomas	6, 11, 16
Condyloma acuminata (genital warts)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Cervical intraepithelial neoplasia	
Unspecified	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Low risk	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
High risk	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Cervical carcinoma	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

هایپرپلازی بافت پوششی کانونی حفره دهان^۱ (بیماری Heck) به‌طور غالب توسط HPV-13 ایجاد می‌شود و به عود خود به خودی گرایش دارد (Burd et al., 2003). Epidermodysplasia veruciformis، یک بیماری نادر ژنتیکی است که در آن زگیل‌های همراه با HPV در روی بالا تنه دیده می‌شود و بالاترین درجه آن در نهایت پیشرفت به سوی کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مهاجم، پاپیلوماهای ورم ملتحمه چشم و یا کارسینوماهای همراه با HPV است. پاپیلوماتوزیس تنفسی عود کننده^۲ در ابتدا یک بیماری گلو در کودکان تا ۳ سال است اما می‌تواند در بالغین نیز ایجاد شود. به خاطر اینکه درصد بالایی از مادران پیشینه‌ای از آلودگی با HPV دارند و به این دلیل که تیپ‌های مشابه هم تولید زگیل‌های دستگاه تناسلی وهم پاپیلوماتوزیس تنفسی عود کننده می‌کنند، به نظر می‌رسد عفونت در کودکان بوسیله گذر از کانال زایمان ایجاد شده باشد. زخم‌های مجاری تنفسی ممکن است دستخوش دگرگونی بدخیم^۳ شوند. در آمریکا سرطان رحم در رده سوم بعد از سرطان پوست و سرطان سینه قرار دارد. در کشورهای درحال پیشرفت، سرطان رحم اغلب بیشترین موارد سرطان در زنان را شامل می‌شود و ممکن است ۲۵ درصد از همه سرطان‌های زنان را در بر بگیرد. سرطان رحم بر سرطان سینه به‌عنوان بیشترین عامل مرگ و میر ناشی از

1. Focal epithelial hyperplasia of the oral cavity
2. Recurrent respiratory papillomatosis
3. Malignant transformation

سرطان در زنان جهان، مقدم شده است. ارتباط بین عفونت تناسلی HPV و سرطان رحم ابتدا در اوایل ۱۹۸۰ بوسیله هارلود زور هاوسن که یک ویروس شناس آلمانی بود مشخص شد. در حال حاضر هم ارتباط بین HPV و کارسینومای سلول‌های سنگفرشی رحم^۱ به خوبی اثبات شده است. ارتباط HPV و کارسینومای سلول‌های سنگفرشی رحم نسبت به رابطه سیگار و سرطان ریه بیشتر است (Burd et al., 2003). دانشمندان در حدود ۳۰ نوع HPV را شناسایی کرده‌اند که از طریق ارتباط جنسی منتشر می‌شوند و به‌طور اولیه رحم، واژن، دستگاه تناسلی خارجی و مخرج را آلوده می‌کنند که از این چهار قسمت بیشتر سلول‌های بد خیم در رحم گزارش شده است و همچنین در اروپا و آمریکا تیپ ۱۶ در نیمی از موارد وجود داشته در حالی که تیپ‌های ۱۸، ۳۱، ۴۵ و ۲۵ تا ۳۵ درصد موارد را شامل می‌شوند (Burd et al., 2003; Gheit et al., 2009; Motoyama et al., 2004). HPV در ۹۹/۷ درصد از سرطان‌های سلول‌های سنگفرشی رحم در جهان یافته شده است. آدنوکارسینومای رحم^۲ نیز با HPV ارتباط دارد، اما این ارتباط کمتر بیان شده و وابسته به سن می‌باشد. در زنان کمتر از ۴۰ سال، HPV در ۸۹٪ از آدنوکارسینوماها وجود دارد در حالیکه در زنان در سن ۶۰ سال و پیرتر، HPV تنها در ۴۳٪ از موارد مشاهده شده است (Burd et al., 2003; Mahdavi et al., 2005).

۱-۲- آناتومی گردن رحم

رحم یک عضو فیبری عضلانی است و معمولاً به گردن رحم در پائین و تنه رحم در بالا تقسیم می‌شود (امیرخانی، ژ. ۱۳۷۳)

۱-۲-۱- گردن رحم

سرویکس در لاتین به معنای گردن است و قسمت باریک و دمی رحم را تشکیل می‌دهد. راس آن در جهت پائین و پشت قرار دارد. اندازه آن در بالغین که حامله نشده‌اند ۳-۲/۵ سانتیمتر بوده و مجاور قسمت تحتانی جسم رحم است (امیرخانی، ژ. ۱۳۷۳).

1. Cervical squamous cell carcinoma
2. Adenocarcinoma

قسمتی از گردن رحم که در واژن دیده می‌شود اگزوسرویکس^۱ یا قسمت واژینال نام دارد. اگزوسرویکس دارای سطح محدب و گرد با منفذی حلقوی یا شکاف مانند (منفذ خارجی) به داخل مجرای اندوسرویکس^۲ است. مجرای اندوسرویکس طولی در حدود ۲-۳ سانتی‌متر دارد و از طرف پروگزیمال^۳ در منفذ داخلی به حفره اندومتر^۴ باز می‌شود. مخاط گردن رحم، عموماً دارای هر دو نوع بافت پوششی مطابق سنگفرشی (مشخصه اگزوسرویکس) و بافت پوششی استوانه‌ای ترشح‌کننده مخاط (مشخصه مجرای اندوسرویکس) است. با وجود این، حد فاصل بین این دو بافت پوششی (محل اتصال سلول‌های پوششی سنگفرشی به استوانه‌ای که SCJ^۵ نامیده می‌شود) از نظر موقعیت متغیر است و به وضعیت تحریک هورمونی بستگی دارد. این حد فاصل نسبت به پیدایش نئوپلازی سنگفرشی بیشترین آسیب‌پذیری را دارد (قره‌باغی، م. پ. ۱۳۷۶) (شکل ۱-۱).

-
1. Exocervix
 2. Endocervix canal
 3. Proximal
 4. Endometrium
 5. Squamous columnar junction