

No Evidence of HPV Infection in Ocular Surface Neoplasia; A PCR-Based Study

Eghtedari M, MD; Jamalipoor F, MD; Azarpira N, MD; Astaneh AR, MD*

Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Corresponding author: ali_shiraz87@yahoo.com

Purpose: To explore any association between human papilloma virus (HPV) infection and ocular surface squamous neoplasia.

Methods: Forty pathological specimens including 20 cases of conjunctival intra-epithelial neoplasia grade I (CIN I) and 20 cases of CIN III and invasive squamous cell carcinoma (SCC) together with 20 pterygium samples (controls) were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) to find any evidence of HPV infection. The examinations were performed on cut sections of paraffin embedded tissue blocks from our laboratory archive.

Results: Mean age of patients at the time of sampling was 56 ± 8 (range, 30-86) years in the CIN I group; 61.7 ± 9 (range, 43-82) years in the CIN III and SCC group and 41.5 ± 10 (range, 24-67) years in the pterygium group. All specimens were negative for HPV.

Conclusion: No association was found between HPV infection and ocular surface neoplasia in our series.

Key words: Human Papilloma Virus, HPV, Ocular Surface, Neoplasia

• Bina J Ophthalmol 2010; 16 (2): 108-112.

Received: 28 April 2010

Accepted: 17 August 2010

ارتباط عفونت HPV بر پایه PCR با تومورهای اپی‌تلیوم سطحی چشم

دکتر معصومه اقتداری^۱، دکتر فاطمه جمالی‌پور^۲، دکتر نگار آذریپرا^۳ و دکتر علیرضا آستانه^۴

هدف: یافتن ارتباط بین عفونت با HPV (human papilloma virus) و تومورهای اپی‌تلیوم سطحی چشم.

روش پژوهش: بیست نمونه تومور داخل اپیتلیومی ملتحمه (CIN: conjunctival intra-epithelial neoplasia) درجه ۱ (CIN-I)، ۲۰ نمونه CIN درجه ۳ (CIN-III) و کارسینوم یاخته سنگ‌فرشی (SCC) و ۲۰ نمونه ناخنک (به عنوان شاهد) به روش PCR (polymerase chain reaction) برای یافتن شواهدی از عفونت HPV ارزیابی شدند. PCR به روش General Primer برای یافتن هرگونه رد پایی از HPV به طور جداگانه برای همه نمونه‌ها انجام شد. ارزیابی‌ها روی قطعات برش‌داده شده از بافت‌های پارافینه موجود در آرشیو آزمایشگاهی انجام شدند.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران هنگام برداشتن نمونه‌ها در گروه CIN-I برابر 56 ± 8 سال (۸۶-۳۰ سال)، در گروه CIN-III و SCC برابر 61.7 ± 9 سال (۸۲-۴۳ سال) و در گروه ناخنک برابر 41.5 ± 10 سال (۶۷-۲۴ سال) بود. همه نمونه‌ها از نظر وجود HPV منفی بودند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه ما هیچ‌گونه رابطه‌ای بین HPV و تومورهای سطحی چشم یافت نشد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۹؛ دوره ۱۶، شماره ۲: ۱۰۸-۱۱۲.

• پاسخ‌گو: دکتر علیرضا آستانه (e-mail: ali_shiraz87@yahoo.com)

دریافت مقاله: ۸ اردیبهشت ۱۳۸۹

تایید مقاله: ۲۶ مرداد ۱۳۸۹

۱- دانشیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۲- دستیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۳- دانشیار- متخصص آسیب‌شناسی- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دکتر معصومه اقتداری- ارتباط HPV با نئوپلازی های سطح چشم

۴- فلوشیپ سگمان قدامی- چشم پزشکی- مرکز چشم پزشکی بصیر شیراز
شیراز- خیابان عفیف آباد- مرکز چشم پزشکی بصیر

مقدمه

تومورهای سنگ فرشی سطح چشم یا OSSN (ocular surface squamous neoplasia) شامل کارسینوم مهاجم سلول سنگ فرشی و کارسینوم داخل اپیتلیومی ملتحمه (CIN: conjunctival intra-epithelial neoplasia) و قرنيه هستند. میزان شیوع OSSN از ۰/۲ تا ۳/۵ نفر به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می باشد. شیوع آن در نزدیکی استوا به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. OSSN عموماً به صورت توموری با رشد آهسته است که به ندرت متاستاز می دهد ولی می تواند باعث تخریب وسیع بافت های مجاور شود.^{۱،۲} OSSN سومین بدخیمی شایع بین تومورهای سطحی چشم به ویژه در دهه ششم زندگی است ولی از ۴ تا ۹۱ سالگی گزارش شده است.^۳

عوامل مستعدکننده OSSN عبارتند از سن بالا، پوست روشن^۴ و پرتو فرابنفش (UV) که امروزه تاکید زیادی به عنوان یکی از عوامل اصلی OSSN روی آن می گردد.^۵ تماس شغلی با محصولات نفتی^۶، مسایل ژنتیکی و پیوند اعضا^۷، XP (xeroderma pigmentosa)^۸ و آلودگی با HIV (human immunodeficiency virus)^۹ نیز به عنوان زمینه های جهت ایجاد OSSN شده اند. مطالعاتی که در اوگاندا و تانزانیا صورت گرفته اند؛ نشان داده اند که آلودگی با HIV، زمینه ای برای عفونت با HPV و سرانجام مستعد شدن به OSSN می گردد.^{۱۰}

یکی از مهم ترین مسایل، ارتباط بین HPV و OSSN می باشد که در مطالعات مختلف نقش آن در ایجاد تومورهای گوناگون از جمله OSSN مورد توجه بوده است. وقتی که نقش HPV به ویژه گونه های ۱۶ و ۱۸ آن به عنوان یک عامل محرک در ایجاد کارسینوم دهانه رحم مطرح گردید^{۱۱}؛ تقریباً عامل ۹۰ درصد از تومورهای داخل اپیتلیومی دهانه رحم به این ویروس نسبت داده شد.^{۱۱} کشف مهم رابطه بین HPV و کانسر دهانه رحم منجر به اهدای جایزه نوبل فیزیولوژی در سال ۲۰۰۸ به Hardszur Hausen گردید. در مطالعات مختلف، HPV به عنوان یک عامل لازم جهت ایجاد CIN دهانه رحم مطرح شد^{۱۲،۱۳}؛ به ویژه گونه های ۱۶ و ۱۸ آن که سازوکار آن از طریق اثرات تلفیقی HPV-DNA در ژنوم انسانی شرح داده شده است^{۱۴،۱۵} و این فرضیه مطرح گردید که تشخیص زودهنگام و درمان فوری موارد آلودگی با HPV برای کاهش تومورهای با مراحل بالا اهمیت دارد.

به دلایل فوق، نظر پژوهشگران به نقش HPV در پیدایش تومورهای سطحی چشم معطوف گردید و تا به حال مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان صورت گرفته اند که نتایج آنها نیز متفاوت بوده اند. متفاوت بودن نتایج مطالعات می تواند به تنوع جمعیت مورد مطالعه، محیط زندگی و به احتمال کم تر، به نبود یک آزمون استاندارد طلایی برای کشف HPV مربوط باشد.^{۱۶} مطالعه حاضر به منظور تعیین ارتباط بین عفونت HPV و OSSN با استفاده از General Primer PCR بر روی نمونه های آسیب شناختی بیماران ارجاع شده به مرکز چشم پزشکی خلیلی شیراز انجام شد.

روش پژوهش

نمونه های بافتی پارافینه از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان خلیلی شیراز مربوط به بیماران چشمی که بین سال های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۷ تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند؛ استخراج گردید و طبق معیارهای تشخیصی، ۴۰ مورد دیسپلازی سلول سنگ فرشی ملتحمه در درجات مختلف و ۲۰ مورد بافت ناخنک به عنوان گروه شاهد، انتخاب شدند. همه نمونه ها جهت بررسی وجود HPV به روش PCR آماده شدند.

DNA از بافت های پارافینه توسط کیت استخراج DNA بافتی (QIAGEN، ساخت استرالیا)، طبق دستور شرکت سازنده (Metabian Germany) استخراج شد. توالی پرایمر به صورت توالی های GP⁺_۵/GP⁺_۶ بودند؛ یعنی: ۳'-GTT-ACT-GTG-GTA-GAT-ACT-ACT-۵'... GP⁺_۵ و ۳'-CAT-ATTTC-۲'-GAA-AAA-TAA-ACT-GTA-AAT-CAT-ATTTC-۵'... GPY⁺.

محصولات PCR توسط ژل الکتروفورز با استفاده از LE (w/v) ۲ درصد آگارز که در برمید اتیدیوم ۰/۵ mg/l رنگ شده بودند؛ آنالیز شدند. به طور خلاصه ۴۰ چرخه (سیکل) آمپلیفیکاسیون در یک حجم ۵۰ μl حاوی ۵۰ میکرومول KCL، ۱۰ میکرومول Tris-HCL، ۲۰۰ میکرومول از هر نوع dNTP، ۳ میکرومول MgCl₂ و یک واحد Taq-DNA polymerase انجام شدند. هر چرخه شامل یک دقیقه مرحله خنثاسازی در دمای ۹۴°C، دو دقیقه گرم کردن تا دمای ۴۰°C و ۱/۵ دقیقه مرحله طویل سازی تا دمای ۷۲°C بود. مرحله خنثاسازی در اولین چرخه به مدت ۴ دقیقه بود. در هر چرخه یک شاهد مثبت (کارسینوم سلول سنگ فرشی سرویکس) و یک شاهد منفی نیز آنالیز شدند. در همه نمونه ها PCR برای بتاگلوبین به

عنوان کنترل داخلی انجام گردید.

دیگری توسط Tuppuraines و همکاران^{۲۱} انجام شد که از چهار مورد تومور چشمی مطالعه شده همگی از نظر وجود HPV منفی گزارش شدند.

در سال ۱۹۹۷، در مطالعه Nakamura و همکاران^{۲۲}، ۸ مورد OSSN، ۴ مورد مثبت و ۴ مورد منفی گزارش نمود. در سال ۲۰۰۲، Scott و همکاران^{۱۵} ده مورد OSSN را برای یافتن HPV گونه ۱۶ و ۱۸ بلا روش PCR تحت بررسی قرار دادند که ۵ مورد برای HPV-۱۶ و ۵ مورد دیگر برای HPV-۱۸ مثبت گزارش شدند. در سال ۲۰۰۳ Tulvatana^{۲۳} ۳۰ مورد OSSN را با روش PCR از نظر وجود HPV بررسی نمود که همگی منفی بودند. Moubayed و همکاران^{۱۸} از ۱۴ مورد OSSN، در ۱۳ مورد آن وجود HPV را مثبت گزارش کردند. در مطالعه دیگری که توسط Sen و همکاران^{۲۴} انجام شد؛ پاپیلومای ملتحمه در ۱۷ درصد موارد از نظر HPV مثبت بود در صورتی که همه موارد OSSN از نظر وجود HPV بر اساس روش PCR منفی گزارش شدند.

Auw-Haedrich و همکاران^{۲۵} مطالعات مهمی در مورد تومورهای چشمی و نقش HPV به عنوان یکی از عوامل احتمالی آن انجام داده‌اند و ارتباط آن را به ویژه با گونه‌های ۱۶ و ۱۸ در چندین مورد گزارش کرده‌اند. Auw-Haedrich و همکاران^{۲۶} در مقاله‌ای دیگر، بیماری با پاپیلومای راجعه ملتحمه بولبار با HPV منفی را گزارش کردند که طی دو سال بعد پاپیلومای او به SCC پیشرفت کرد و با آزمایش PCR، HPV-۱۶ او مثبت گزارش گردید. در مطالعه دیگری که در آلمان توسط Guthoff و همکاران^{۲۷} انجام شد وجود HPV را در اکثر نمونه‌های OSSN مورد مطالعه منفی گزارش کردند. در مطالعه دیگری که در هندوستان توسط Manderwad و همکاران^{۲۸} انجام شد؛ از ۵۰ نمونه OSSN از آرشیو، بر اساس PCR، هیچ مورد مثبتی از HPV گونه‌های ۱۶ یا ۱۸ گزارش نگردید.

در مطالعه ما، مراحل مختلف CIN از دیسپلازی خفیف تا SCC مهاجم که ۴۰ مورد از نمونه‌های مار را شامل می‌شدند و هم‌چنین ۲۰ نمونه از بافت ناخنک که به عنوان شاهد انتخاب شده بودند؛ همگی از نظر وجود HPV منفی بودند. از سوی دیگر کشف HPV-DNA با موارد کنترل مثبت و منفی مقایسه شد تا اعتبار آنالیزها بیش‌تر شود. بروز عفونت HPV در دهانه رحم و نقش این ویروس در ایجاد دیسپلازی دهانه رحم در کشور ما تقریباً همانند سایر نقاط دنیا نشان داده شده است^{۲۹،۳۰} ولی به نظر می‌رسد که در کشور ما مانند بسیاری از جوامع دیگر، عفونت HPV تاثیر کمی بر شیوع تومورهای سطحی چشم دارد. با در نظر گرفتن این واقعیت

یافته‌ها

در این مطالعه، ۶۰ نمونه از بافت‌های پارافینه شامل ۲۰ نمونه مربوط به بیماران با CIN درجه I، ۲۰ نمونه CIN درجه III و SCC مهاجم و ۲۰ نمونه ناخنک مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های گروه CIN-I مربوط به بیماران با محدوده سنی ۳۰ تا ۸۶ سال (میانگین ۵۶±۸ سال) شامل ۱۰ زن و ۱۰ مرد بودند. در گروه CIN-III و SCC محدوده سنی بیماران بین ۴۳ تا ۸۲ سال (میانگین ۶۱٫۷±۹ سال) بود و شامل ۹ زن و ۱۱ مرد بودند. بافت‌های ناخنک به عنوان گروه شاهد مربوط به افراد ۲۴ تا ۶۷ ساله (میانگین ۴۱٫۵±۱۰ سال) بودند که از ۱۳ زن و ۷ مرد تشکیل می‌شدند. همه نمونه‌ها طبق استانداردهای بین‌المللی برای وجود هرگونه رد پایی از HPV، به طور جداگانه و با استفاده از General Primer GP۵-GP۶ جهت حساسیت بیش‌تر PCR برای یافتن HPV ارزیابی شدند. همه نمونه‌ها در هر سه گروه از نظر وجود هر گونه HPV منفی بودند. PCR برای بتاکلوبین انسانی مثبت بود لذا دقت روش تایید گردید.

بحث

در مطالعه ما هیچ مورد مثبتی از HPV یافت نشد تا بتوان نقش این ویروس را به عنوان عاملی در ایجاد OSSN در این بیماران در نظر گرفت. از زمان کشف HPV (۱۸ و ۱۶) به عنوان عامل اصلی ایجاد کانسر سرویکس توسط Hards zur Hausen که منجر به دریافت جایزه نوبل فیزیولوژی در سال ۲۰۰۸ توسط ایشان گردید؛ ارتباط گونه‌های مختلف HPV با سایر تومورهای نقاط مختلف بدن طی بررسی‌های متعدد از جمله تومورهای خوش‌خیم مثل پاپیلوما و تومورهای بدخیم و مهاجم مثل SCC ثابت گردید^{۱۳،۱۲}.

تا کنون مطالعات متعددی جهت یافتن رابطه بین HPV و OSSN انجام شده‌اند که با توجه به موقعیت جغرافیایی، تراکم جمعیت و عوامل دیگر، در نقاط مختلف، نتایج کاملاً متفاوتی گزارش شده‌اند. برای مثال در بعضی از کشورها در نواحی استوایی مانند تانزانیا و اوگاندا، HPV به عنوان یک عامل خطر ساز برای SCC تهاجمی در بیماران مبتلا به ایدز نشان داده شده است^{۱۷-۱۹}. در بررسی Mc Donnell و همکاران^{۲۰} که در سال ۱۹۹۲ بر روی ۴۳ مورد OSSN انجام شد؛ ۴۲ مورد از نظر وجود HPV مثبت بودند که ۳۷ مورد آن مربوط به HPV تایپ ۱۶ بودند. در همان سال مطالعه

مشابه در سطح وسیع‌تر می‌تواند در شناسایی علل پیش‌رفت دیسپلازی به کارسنیوم مهاجم در سطح چشم کمک‌کننده باشد.

که OSSN در منطقه مورد مطالعه ما نادر نیست؛ به نظر می‌رسد که عوامل خطر ساز دیگری در ایجاد آن در کشورمان نقش داشته باشند و توجه بیشتر به سایر عوامل خطر ساز و انجام مطالعات

منابع

- Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv Ophthalmol* 1995;39:429-450.
- Grossniklaus HE, Green WR, Luckenbach M, Chan CC. Tumors of the conjunctiva. A clinical and histopathologic review. *Cornea* 1987;6:78-116.
- Lee GA, Hirst LW. Retrospective study of ocular squamous neoplasia. *Aust N Ophthalmol* 1997;25:269-276.
- Kiire CA, Dhillon B. The etiology and associations of conjunctival intra epithelial neoplasia. *Br J Ophthalmol* 2006;90:109-913.
- Lee GA, Williams G, Hirst Lw, Green AC. Risk factors in the development of ocular surface epithelial dysplasia. *Ophthalmology* 1994;101:360-364.
- Waddell KM, Newton R. The aethiology and associations of conjunctival intraepithelial neoplasia. *Br J Ophthalmol* 2007;91:120-121.
- Macareza R, Bossiss S, Robinent A, Le Callonec A, Charlin JF, Colin J. Conjunctival Epithelial Neoplasia in organ transplant patients receiving cyclosporine therapy. *Cornea* 1999;18:495-497.
- Hertle RW, Durso F, Metsler JP, Varsa EW. Epibulbar SCC in brothers with xeroderma pigmentosa. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1991;28:350-355.
- Karp CL, Scott IU, Chang TS, Pflugfelder SC. Conjunctival intraepithelial neoplasia: A possible marker for human immunodeficiency virus infection? *Arch Ophthalmol* 1996;114:257-261.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. HPV is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-337.
- Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, et al. Recurrent HPV infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesion: a longitudinal study of 3091 women. *Int J Cancer* 2002;102:519-525.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of HPV status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening, a prospective study. *Lancet* 1999;354:20-25.
- Shiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:394-398.
- Scott IU, Karp CL, Nuovo GJ. Human papilloma virus 16 and 18 expression in conjunctival intra epithelial neoplasia. *Ophthalmology* 2002;109:542-547.
- Eng HL, Lin TM, Chen SY, Wu SM, Chen WJ. Failure to detect human papilloma virus DNA in malignant epithelial neoplasm of conjunctiva by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 2002;117:429-436.
- Newton R, Ziegler J, Ateenyi-Agaba C, Bousarghin L, Casabonne D, Beral V, et al. The epidemiology of conjunctival squamous cell carcinoma in Uganda. *Br J Cancer* 2002;87:301-308.
- Moubayed P, Mwakyoma H, Schneider DT. High frequency of human papillomavirus 6/11, 16, and 18 infections in precancerous lesions and squamous cell carcinoma of the conjunctiva in subtropical Tanzania. *Am J Clin Pathol* 2004;122:938-943.
- Timm A, Stropahl G, Schittkowski M, Sinzidi C, Kayembe D, Guthoff R. Association of malignant tumors of the conjunctiva and HIV infection in Kinshasa (d. R. Congo). First results. *Ophthalmologie* 2004;101:1011-1016.
- McDonnell JM, McDonnell PJ, Mounts P, Wu TC, Green WR. Demonstration of papillomavirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:184-189.
- Tuppurainen K, Raninen A, Kosunen O, Kankkunen JP, Kellokoski J, Syrjänen S, et al. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. Failure to demonstrate HPV DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992;70:248-254.
- Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1997;81:308-313.
- Tulvatana W, Bhattarakosol P, Sansopha L, Sipiyrarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, et al. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol* 2003;87:396-398.
- Sen S, Sharma A, Panda A. Localization of HPV in Conjunctival neoplasia: a retrospective study. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:361-363.
- Auw-Haedrich C, Martin G, Spelsberg H, Sundmacher R, Freuderberg N, Maler P, et al. *Open Ophthalmology J* 2008;2:48-56.
- Auw-Haedrich C, Bredow L, Martin G, Reinhard T, Mittelveifhaus H. Recurrent conjunctival papilloma progressing into squamous cell carcinoma with change of HPV-finding during the course. *Br J Ophthalmol* 2009;93:932-937.
- Guthoff R, Marx A, Stroebel P. No evidence for a pathogenic role of human papillomavirus infection in ocular surface squamous neoplasia in Germany. *Curr*

- Eye Res* 2009;34:666-671.
28. Manderwad GP, Kannabiran C, Santosh G, Geetak H. Human papilloma virus in ocular surface squamous neoplasia in Indian Archives of Pathology Laboratory Medicin 2009;133:1246-1250.
29. Mortazavi S, Zali M, Raoufi M, Nadji M, Kowsarian P, Nowroozi A. The prevalence of human papillomavirus in cervical cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002;3:69-72.
30. Ghaffari SR, Sabokbar T, Mollahajian H, Dastan J, Ramezanzadeh F, Ensani F, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women with normal and abnormal cervical cytology in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006;7:529-532.