

Wykrywanie HPV techniką reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w utrwalonych w parafinie tkankach raka szyjki macicy

Detection of HPV by polymerase chain reaction (PCR) in paraffin embedded cervical cancer tissue

Agnieszka Olszak, Beata Smolarz, Elżbieta Kozłowska, Andrzej Kulig

Cel. Badania epidemiologiczne wskazują, że infekcja różnymi typami wirusa HPV (*Human Papillomavirus*) jest czynnikiem ryzyka dla rozwoju raka szyjki macicy.

Materiały i metody. W obecnej pracy analizowano obecność wirusa HPV wysokiego i niskiego ryzyka u chorych na raka szyjki macicy. Materiał do badań stanowiły utrwalone w parafinie tkanki uzyskane od 22 kobiet z rakiem szyjki macicy. Obecność wirusa HPV określano przy użyciu metody PCR z zastosowaniem odpowiednio dobranych starterów.

Wyniki. Wirus HPV wysokiego ryzyka został wykryty w 82% (18/22) przypadków raka szyjki macicy, natomiast wirus niskiego ryzyka w grupie 18% chorych na ten nowotwór (4/22). Liczba przypadków wirusa wysokiego ryzyka była statystycznie znacząco wyższa niż niskiego ryzyka ($P < 0,05$).

Wniosek. Metoda PCR jest szybką i czułą techniką wykrywania HPV w próbkach uzyskanych od chorych na raka szyjki macicy.

Słowa kluczowe: HPV, rak szyjki macicy, PCR

(Przegląd Menopauzalny 2003; 4:36–39)

Wstęp

Rak szyjki macicy zaliczany jest na świecie do jednej z pięciu najczęstszych przyczyn zgonów kobiet z chorobą nowotworową. Jednym z ważnych czynników w jego rozwoju, a także w rozwoju dysplazji, jest zakażenie wirusem *papilloma* typu ludzkiego (*Human Papillomavirus* – HPV) [1, 2]. Ludzki wirus brodawczaka należy do rodziny *Papovaviridae*. Rodzina ta obejmuje 2 rodzaje *Papillomavirus* i *Polyomavirus* [3, 4]. Cechą tej rodziny

jest obecność podwójnej kolistej nici DNA. Zakażenie wirusem z rodziny *Papovaviridae* prowadzi do zniszczenia komórki, ale może także dojść do ciągłego zakażenia prowadzącego do transformacji komórek oraz rozwoju procesu nowotworowego. W łagodnych formach nowotworów szyjki macicy DNA wirusa HPV występuje najczęściej w postaci wolnej, niezintegrowanej z genomem komórki, kolistej formy określanej jako episom. Jednak w dużym odsetku raków szyjki DNA wirusa jest zintegrowany z genomem gospodarza.

Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig



Komórkami docelowymi dla wirusów HPV są komórki warstw rozrodczych skóry i błon śluzowych. Klinicznym efektem zakażenia są brodawki skóry, błon śluzowych: jamy ustnej, dróg oddechowych, narządów płciowych i układu moczowego [5, 6]. Wśród wirusów infekujących błony śluzowe układu moczowo-płciowego wyodrębniono ok. 40 typów, wykazujących związek z różnego rodzaju zmianami w obrębie narządów płciowych kobiet [7]. W zależności od stopnia zagrożenia rozwojem choroby nowotworowej wyróżniono 3 grupy ryzyka z najczęściej występującymi typami HPV. Pierwsza z nich to grupa niskiego ryzyka onkologicznego. Należą do niej HPV: 6, 11, 42, 43, 44. DNA tych typów wykrywany jest najczęściej w łagodnych zmianach rozrostowych, jak *condylomata acuminata*. Druga grupa to grupa średniego ryzyka onkologicznego z typami HPV: 31, 33, 35, 39, 51, 52 i 58. Ich obecność związana jest z dysplazjami małego i średniego stopnia. Ostatnią grupą jest grupa wysokiego ryzyka onkologicznego. Zalicza się do niej typy HPV: 16, 18, 45 i 56, określane mianem typów onkogennych. Ich DNA jest najczęściej wykrywany w zaawansowanych zmianach nowotworowych w obrębie szyjki macicy [8, 9].

Wykrywanie HPV stało się możliwe dopiero po wprowadzeniu metod stosowanych w biologii molekularnej a zwłaszcza techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Metoda PCR (ang. *polymerase chain reaction*) należy w chwili obecnej do technik najczęściej stosowanych w biologii molekularnej. Technika PCR umożliwiła gwałtowny rozwój diagnostyki molekularnej ostatnich 10 lat. Dokonała ona przełomu w diagnostyce klinicznej dlatego, że nie wymaga stosowania radioaktywnych izotopów, a ilość uzyskiwanego DNA jest wystarczająca do bezpośredniej obserwacji i oceny podczas rozdzielów elektroforetycznych. Ważnym atutem metody PCR jest jej czułość, wydajność i specyficzność. Najprostszym zastosowaniem reakcji PCR w diagnostyce medycznej jest wykazanie obecności lub nieobecności specyficznego fragmentu DNA. Wykazanie obecności lub braku produktu PCR znalazło zastosowanie w wykrywaniu delecji powodujących występowanie chorób dziedzicznych, np. dystrofii mięśniowej Duchenne'a lub Beckera, w licznych testach na obecność wirusa HIV, HPV czy *Hepatitis B*.

W obecnej pracy technika PCR została wykorzystana w celu szybkiego i precyzyjnego określenia obecności lub braku wirusa HPV, zarówno z grupy wysokiego, jak i niskiego ryzyka w utrwalonych w parafinie tkankach raka szyjki macicy.

Materiały i metody

I Pacjentki z rakiem szyjki macicy

Materiał do badań w postaci utrwalonych w parafinie wycinków z guza szyjki macicy został uzyskany od

22 kobiet z rakiem szyjki macicy. Pacjentki mieściły się w przedziale wiekowym od 59 do 82 lat (średnia wieku \pm SD 66,43 \pm 6,68 lat).

II Izolowanie DNA

Pierwszy etap procedury obejmował izolowanie genomowego kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), który następnie poddawano amplifikacji w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

DNA izolowano ze skrawków parafinowych o grubości 10 μ m utrwalonych na szkiełku.

Materiał parafinowy:

- usuwano ze szkiełka i umieszczano w probówce Eppendorfa,
- wytrząsano 3-krotnie ksylenem, odwirowując za każdym razem 3 min na maksymalnych obrotach (8 000 g),
- uzyskany osad przemywano raz 96% alkoholem etylowym, również odwirowując 3 min,

Z tak uzyskanego materiału izolowano DNA z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Uzyskany DNA wykorzystywano w reakcji łańcuchowej polimerazy.

III Reakcja PCR

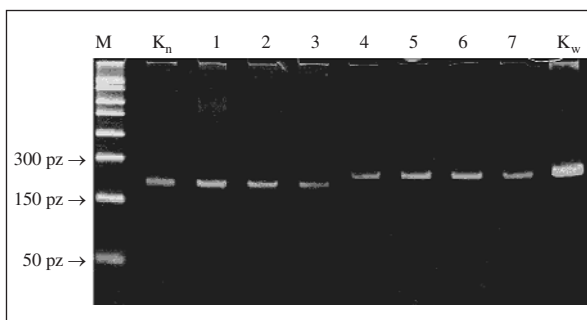
Reakcja PCR była przeprowadzona z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu PCR Human Papillomavirus Typing Set (Biokom). W badaniach zostały zastosowane dwie pary 20 nukleotydowych starterów, których sekwencje odpowiadają fragmentom sekwencji genów wirusowych E6 i E7 HPV. Para pU-1M/pU-2R pozwala na amplifikację DNA HPV z grupy wysokiego ryzyka onkologicznego (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 51b, 58), natomiast para pU-31B/pU-2R na amplifikację DNA HPV grupy niskiego ryzyka onkologicznego (HPV 6 i 11). Mieszanina reakcyjna (25 μ l) obejmowała: 60 ng DNA, 0,2 μ M starterów, 50 μ M dNTP (deoksynukleotydotrifosforany), bufor 10 x Taq, 1 U polimerazy Taq (Qiagen, Niemcy). Reakcję prowadzono w termocyklerze (GeneAmp PCR system 2400; Perkin Elmer, Norwalk, USA).

Etapy reakcji PCR były następujące: wstępna denaturacja 94°C – 2 min, właściwe 30 cykli, na które składała się: denaturacja w 94°C – 1 min, hybrydyzacja ze starterami 55°C – 2 min, wydłużanie 72°C – 2 min, końcowe wydłużanie 7 min w 72°C.

Analizę produktu prowadzono w 7% żelu poliakryloamidowym (PAGE) i po ok. 2 godz. elektroforezy (napiecie stosowane 8 V/cm) analizowano po barwieniu bromkiem etyldyny.

Wirus HPV wysokiego ryzyka charakteryzował się obecnością w żelu pasma o długości 268 pz; wirus HPV niskiego ryzyka pasmem o długości 228 pz (ryc. 1.).





Ryc. 1. Typowy obraz elektroforezy przeprowadzonej w 7% żelu poliakrylamidowym. Ścieżki 1–3 przedstawiają obraz charakterystyczny dla wirusa HPV niskiego ryzyka, ścieżki 4–7 obraz charakterystyczny dla wirusa HPV wysokiego ryzyka, K_n – kontrola pozytywna HPV niskiego ryzyka, K_w – kontrola pozytywna HPV wysokiego ryzyka, M – marker długości par zasad (Sigma, St. Louis, USA)

IV Analiza statystyczna

Żaden z parametrów odnoszących się do materiału nowotworowego nie podlegał rozkładowi normalnemu (test Smirnowa-Kolmogorova) i dlatego dla analizy wyników zastosowano testy nieparametryczne. $P <$ było traktowane jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

Częstość wirusa HPV wysokiego i niskiego ryzyka u chorych na raka szyjki macicy została przedstawiona w tab. I. 18 z 22 próbek rakowych (82%) charakteryzowało się obecnością DNA wirusa HPV wysokiego ryzyka, natomiast tylko 4 z 22 przypadków (18%) wykazywało obecność DNA wirusa niskiego ryzyka. Obecność DNA wirusa HPV wysokiego ryzyka w komórkach rakowych była statystycznie znacząco wyższa niż DNA wirusa HPV niskiego ryzyka ($P < 0,05$).

Dyskusja

W profilaktyce raka szyjki macicy duże znaczenie ma nie tylko wczesne wykrywanie zmian, ale także określenie czynników, mających najbardziej prawdo-

podobny związek etiopatogenetyczny z procesem kancerogenezy w obrębie tego narządu. Wykrywając osoby zainfekowane wirusem HPV można określić grupę wysokiego ryzyka onkologicznego, którą można następnie poddać ściślejszej kontroli. Próby oszacowania częstości występowania zakażeń wirusem HPV wśród kobiet z chorobą przebiegającą subklinicznie lub w sposób utajony, przynosi różne wyniki, zależnie od badanej populacji i metody stosowanej w celu wykrycia wirusa. Ludzkie wirusy *papilloma* nie namnażają się w hodowlach komórkowych, nie opracowano również do tej pory modelu zakażenia zwierząt i namnożenia wirusów. W związku z trudnością uzyskania antygenu wirusowego w hodowlach *in vitro* nie mogą być stosowane standardowe metody serologiczne. Wykrywanie infekcji HPV stało się więc możliwe dopiero po wprowadzeniu metod stosowanych w biologii molekularnej. Największy odsetek zakażeń rozpoznaje się stosując reakcję PCR, która charakteryzuje się największą czułością z obecnie znanych technik biologii molekularnej. Pozwala ona na wykazanie jednej kopii HPV na 10^5 – 10^6 komórek.

Technika PCR staje się obecnie powszechną techniką diagnostyczną, stosowaną w wielu laboratoriach. W celu standaryzacji stosowanej procedury, opracowywane są odpowiednie sekwencje starterów. Uzyskiwane na tej podstawie wyniki są porównywalne i pozwalają w pewnym stopniu uniknąć fałszywej ich interpretacji.

Oprócz tradycyjnej metody PCR niektóre ośrodki badawcze stosują technikę PCR *in situ* z udziałem odpowiednio znakowanych nukleotydów. Metoda PCR *in situ* charakteryzuje się bardzo dużą czułością i pozwala na precyzyjne wykrycie bardzo małej liczby kopii wirusowego DNA (nawet pojedynczej kopii genu wirusowego). Jest to jednak metoda dosyć kosztowna i wymagająca specjalistycznej aparatury [10].

Analizę danego typu wirusa HPV prowadzi się przy zastosowaniu metody PCR-RFLP (PCR-RFLP – *restriction fragment length polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Technika PCR-RFLP polega na amplifikacji określonego fragmentu genu, obejmującego sekwencję polimorficzną, będącą miejscem cięcia restrykcyjnego [11]. Po trawieniu restryktazą otrzymuje się różną liczbę fragmentów restrykcyjnych, o różnej długości, zależnie od wersji allelu. Do określenia typu wirusa stosuje się

Tab. I. Częstość występowania wirusa HPV wysokiego i niskiego ryzyka u chorych na raka szyjki macicy

Pacjentki z rakiem szyjki macicy (n = 22)			
HPV wysokiego ryzyka		HPV niskiego ryzyka	
obecność	brak	obecność	brak
18 (0,82) ^a	4 (0,18)	4 (0,18)	18 (0,82)

^a $P < 0,05$ w porównaniu z grupą niskiego ryzyka



analizę restrykcyjną z wykorzystaniem czterech endonukleaz restrykcyjnych *AvaII*, *AccI*, *BglIII*, *RsaI*. Analiza produktów amplifikacji odbywa się przy zastosowaniu techniki elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Ilościowe oznaczanie kopii genów wirusa HPV prowadzi się z użyciem analizy densytometrycznej, po uprzednim przetworzeniu żeli poliakrylamidowych na obraz cyfrowy.

W obecnej pracy podjęto próbę wykrywania wirusa HPV w utrwalonych w parafinie tkankach przy zastosowaniu techniki PCR. Reultaty wskazują, że jest to metoda skuteczna, prosta oraz szybka i z powodzeniem może być stosowana w przypadku materiału archiwalnego.

Praca powstała w ramach grantu uzyskanego z Komitetu Badań Naukowych nr 3P05C06823.

Summary

Purpose. *Epidemiological studies showed that infections with several types of Human Papillomavirus (HPV) are the main risk factor for the development of cervical carcinoma.*

Materials and methods. *In the present work the infection of high risk as well as low risk HPV in subjects with cervical cancer were investigated. Paraffin embedded tumour tissues were obtained from 22 women with cervical carcinoma. The HPV appearance was determined by PCR amplification using the appropriate primers.*

Results. *The high risk HPV was detected in 82% (18/22) of cervical cancer patients and low risk HPV in 18% of cervical cancer patients (4/22). The number of samples with high risk HPV was significantly higher than low risk samples ($P < 0.05$).*

Conclusion. *The PCR is a rapid and sensitive method for the detection of HPV in paraffin embedded cervical cancer samples.*

Key words: HPV, cervical cancer, PCR

Piśmiennictwo

1. Bosch FX, Manos MM, Munoz N. *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. a worldwide perspective.* International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 1995; 87: 796-802.
2. zur Hausen H. *Papillomavirus infections – a major cause of human cancers.* *Biochim Biophys Acta*, 1996; 1288: 55-78.
3. Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL., Brown F. *Classification and Nomenclature of Viruses.* *Arch Virol*, 1991; 2: 147.
4. Boubenider S, Hiesse C, Marchand S, et al. *Post-transplantation polyomavirus infections.* *J Nephrol* 1999; 12: 24-9.
5. Szkoda T M, Litwińska B, Kańtoch M. *Ludzkie wirusy papilloma: budowa, patogeneza, diagnostyka.* *Post Mikrobiol* 1995; 1: 187-96.
6. Kańtoch M. *Wirusologia lekarska.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
7. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. *Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction.* *Cancer* 1996; 77: 2275-9.
8. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. *Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the ulva by polymerase chain reaction.* *Obstet Gynecol* 1997; 89: 81-4.
9. Qiu X, Zhao M, Tan Y, et al. *The synchronous detection of HPV, H-ras and p53 in cervical carcinoma tissues and distribution of HPV infection between the high incidence area and the common area.* *Exp Oncol* 2002; 24: 194-7.
10. Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A. *Detection of human papilloma virus DNA in formallin-fixed paraffin embedded tissues in situ hybridization after amplification by polymerase chain reaction.* *Am J Pathol* 1991; 139: 847-54.
11. Massimo L. *Polymerase chain reaction – based methods for the detection of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes.* *Hum Pathol* 1994; 25: 564-71.

Adres do korespondencji

Beata Smolarz
Pracownia Biologii Molekularnej
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łódź

