

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& scientific research
University of Baghdad
College of Medicine



*The association of Human Papillomavirus
in Surface Epithelial Ovarian Carcinomas
with Its Effect on the Expression of p53 &
Retinoblastoma Tumor Suppressor Genes*

A Thesis

Submitted To College Of Medicine

And The Committee Of Postgraduate Studies Of Baghdad

University In Partial Fulfillment Of The Requirements For The

Degree Of Doctor Of Philosophy In Medical

Microbiology/Virology

By

Sana'a Mohammed Husain Alizi

B.Sc.1993, M.Sc.2002

Supervised by

Professor

Dr. Faiza Abdullah Mukhlis

M.SC., Ph.D. (Medical Virology)

Professor

Dr. Ban A. Abdul-Majeed

M.SC., Ph.D. (Molecular Pathology)

2011AD

1432 H

Abstract

Background

Human papillomaviruses (HPV) belong to papillomaviridae family that has a particular tropism for the epithelium inducing its proliferation. It has been shown that E6 and E7 protein is capable of binding and inactivating the P53 and Retinoblastoma (Rb) tumor suppressor genes. These interactions are responsible for the transforming activity of HPV. The role of HPV infection in etiology of ovarian cancer remains unclear and the results are controversial. Several studies have verified the presence of HPV DNA in both benign and malignant ovarian tissues. Therefore, it is not surprising that there is considerable interest in the role of HPV in ovarian carcinoma.

Objectives of the study

1. Determine the role of HPV high risk types (16&18) and low risk types (6&11) in surface epithelial ovarian carcinoma compared to benign and control groups.
2. Estimation of any possible association of HPV low and high risk types with wild type P53 and Rb mRNA signals in surface epithelial ovarian carcinoma compared to benign tumor and control groups.
3. Evaluation of p53 tumor suppresser gene over expression among study groups.

Materials And Methods

This study was designed as a retrospective one. It involved 79 selected formalin fixed, paraffin embedded ovarian tissue blocks including 28 blocks of surface epithelial ovarian carcinomas, 28 blocks of

benign epithelial ovarian tumors, and 20 blocks of normal ovarian tissues as a control, . Beside these main groups, 3 blocks were also seen which were diagnosed as border line tumors. The age of those cases range from 20 to 72 years old. Specimens were collected from the department of Histopathology –Teaching Laboratories that belongs to the Medical City Teaching Hospital, private laboratories in Baghdad, and Al-Elweiya hospital in Baghdad and that belong to the period from June 2007 to June 2010.

The practical part of this study performs the followings:

1. Tissue sectioning and preparation on charge slides.
2. Histopathological sections were stained by hematoxyline- eosin stain for definitive diagnosis.
3. Molecular detection and genotyping of HPV DNA were performed in tissue blocks by using in situ hybridization (ISH) technique for detecting and localization of high risk HPV (16&18) and low risk HPV (6&11) types.
4. The presence of wild type P53 and Rb mRNA signals were conducted by using ISH technique.
5. Immunohistochemistry technique was used to demonstrate the over-expression state of p53 tumor suppressor gene.

Results

1. The most common histological types of surface epithelial ovarian carcinoma among Iraqi patients were serous type (49%) followed by mucinous type (35.6%).
2. The age of study groups range from 20 to 72 years old, surface epithelial ovarian carcinoma was increased with age which was

(28.6%) in (60-69) years while the benign tumor was decreased with age which was 39% in (20-29) years followed by 36% in (30-39) years.

3. The presence of ISH signals for HPV DNA (16, 18, 6, and 11) in benign group (71%) was higher than that found in malignant group (64%). HPV 16 was the most predominant type followed by HPV18, HPV6, and HPV11 in malignant (39.3%, 35.7%, 21.4%, and 17.9%) and benign groups (46.4%, 42.9%, 35.7%, and 25%) respectively.
4. High risk types of HPV DNA signal were higher in the low score of HPV16 (28.6% & 17.9%) and HPV18 (35.7% & 25%) respectively for both malignant and benign tumors. High percentage of HPV16 was found in high intensity (17.8%) of malignant group, and with moderate intensity (21.4%) in benign group. HPV18 was higher in low intensity (14.3%) of malignant group and in high intensity (21.4%) of benign group. Significant difference was found between ISH HPV16&18 results on comparing signal score and intensity among study groups.
5. Low risk HPV6&11 DNAs signals were detected in high score (17.9% for both HPV types) and high intensity (17.9% for HPV6 & 10.7% for HPV11) in benign tumors which was significantly differed from that with malignant tumors, which revealed low score (21.4% for HPV6 & 14.3% for HPV11) and low intensity (10.7% for both HPV types).
6. Tumor suppressor genes in ovarian tumors
 - P53 mRNA was detected in 42.9% of malignant tumors and 21.4% of benign tumors. Significant difference was found among study groups.

- Rb mRNA was detected in 39.3% of malignant group and 25% of benign group. No significant difference was found among study groups.
- Over expression of P53 was detected by IHC in 64.3% of malignant group and 21.4% of benign group. Significant difference was found among study groups and according to signal score and intensity.

7. Association between ISH HPV DNA and Tumor suppresser genes

- No Significant difference was found between the presence of p53 mRNA ISH and ISH HPV DNA of HPV16, 18, 6, and 11 among all study groups, except the association between P53 mRNA ISH signal and HPV6 was significant in benign group. Same results were found regarding Rb-ISH mRNA except that HPV18 showed significant association with Rb-ISH mRNA in benign group.
- No significant differences were found between over expression of P53 protein and the presence of HPV DNA16, 18, 6, and 11 among all study groups, except a significant association was found between P53 IHC signal and HPV11 ISH signal in benign group.

8. Co infections

- The percentage of co-infection of low risk HPV6&11 in benign group (16.9%) was higher than malignant group (7.1%). Only significant difference was found in combination of both high and low risk HPV types.
- No significant differences or association were found between the presence of HPV co-infections (high, low risk types, and

both) with ISH-P53 mRNA on comparing study groups. Same results were found regarding Rb-ISH with HPV co-infections.

- No significant differences or association were found between the presences of HPV co-infections of high and low risk types with P53-IHC while significant differences were found in the presence of both HPV co-infections with P53-IHC protein on comparing study groups.

Conclusions

The study results are consistent with previous studies which appears that HPV infection may plays a relatively role in the pathogenesis of ovarian carcinomas or it could facilitate its progression. We should consider data related to HPV type-matching to be an ancillary rather than a definitive data.

Our findings warrant future studies to confirm the role of HPV in ovarian carcinoma and the interaction with tumor suppressor genes or other cellular proteins which must be studied with large sample size in Iraqi population.



مهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد/كلية الطب
م الأحياء المجهرية

علاقة الفيروس الحليمي البشري في السرطان الطلاني
السطحي للمبيض وتأثيره على الجينات الكابحة للسرطان ب53
والرتينوبلاستوما

اطروحة مقدمة الى
كلية الطب - جامعة بغداد
كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في الأحياء المجهرية/الفيروسات

من قبل
سناء محمد حسين العزي
بكلوريوس - ماجستير / أحياء مجهرية

إشراف

أ. د. فائزة عبد الله

أ. د. بان عباس عبد المجيد
مخلص

ماجستير - دكتوراه / فيروسات

ماجستير - دكتوراه / علم الأمراض الجزيئي
طبية

1432 هـ

2011 م

الخلاصة

تمهيد

يعود الفيروس الحليمي البشري الى عائلة الفيروسات الحليمية المحبة للخلايا الطلائية والتي تؤدي الى تحفيز تكاثرها. وقد ثبت ان بروتين E6 و E7 قادر على الارتباط وتثبيط الجينات الكابحة للسرطان P53 والرتينوبلاستوما. هذه التفاعلات مسؤولة عن تحويل فاعلية الفيروس الحليمي البشري. دور الفيروس الحليمي البشري كمسبب لسرطان المبيض ظل غير واضح ونتائجه متضاربة. عدة دراسات اثبتت وجود الفيروس الحليمي البشري في الاورام الحميدة والخبيثة لانسجة المبيض. لهذا السبب صار من الضروري ان ندرس دور هذا الفيروس بسرطان المبيض.

اهداف الدراسة

1. تحديد دور انواع الفيروس الحليمي البشري ذات الخطورة العالية (16 و 18) وذات الخطورة الواطئة (6 و 11) في سرطان الخلايا الطلائية السطحية للمبيض مقارنة بمجموعة الاورام الحميدة والسيطرة.
2. تقييم امكانية وجود اي علاقة بين انواع الفيروس الحليمي البشري العالية الخطورة والواطئة الخطورة مع الحامض النووي الرايبوزي الرسول للنوع البري P53 والرتينوبلاستوما في سرطان الخلايا الطلائية السطحية للمبيض مقارنة بمجموعة الاورام الحميدة والسيطرة.
3. تقييم تراكم النوع الطافر للجين الكابح للسرطان p53 في مجاميع الدراسة.

المواد وطرق العمل

صممت هذه الدراسة كبحث ذو أثر رجعي اشتملت على 79 خزعة نسيجية من المبيض والمحفوظة بالفورمالين والمطمورة بشمع البارافين تضمنت 28 خزعة نسيجية للاورام السطحية الطلائية الحميدة للمبيض و 28 للاورام السطحية الطلائية الخبيثة للمبيض و 20 خزعة سيطرة اضافة الى ثلاث نماذج بالحد الفاصل وتتراوح اعمارهم ما بين 20-72 سنة . وقد جمعت هذه النماذج من قسم الامراض النسيجية في المختبرات التعليمية لمستشفى مدينة الطب التعليمية ومن المختبرات الاهلية ومستشفى العلوية في بغداد من حزيران 2007 ولغاية حزيران 2010. الجانب العملي لهذه الدراسة شمل التالي:

1. تقطيع وتحضير المقاطع النسيجية على شرائح مشحونة
2. تم صبغ شرائح المقاطع النسيجية بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين لتأكيد التشخيص
3. تم تحديد النوع الجيني والجزيئي ل(دنا) الفيروس الحليمي البشري للمقاطع النسيجية وذلك بواسطة تقنية التهجين الموضعي لتحديد وجود الانواع العالية الخطورة والواطئة الخطورة للفيروس وتحديد موقعها.
4. تم تحديد وجود الحامض النووي الرايبوزي الرسول للنوع البري P53 والرتينوبلاستوما بواسطة تقنية التهجين الموضعي.
5. استخدمت التقنية الكيميائية النسيجية المناعية لتعيين تراكم التعبير الجيني للبروتين P53 .

النتائج

1. يعتبر نوع السرطان ال serous هو اكثر (49%) انواع السرطان المبيضي الطلائي السطحي شيوعا في العراق ويتبعه نوع ال (36%) mucinous.
2. اعمار مجاميع الدراسة تتراوح ما بين (20-72) وتزداد الاورام الخبيثة للمبيض مع تقدم العمر فقد كانت 29% ضمن المجموعة (60-69) سنة وتقل الاورام الحميدة للمبيض بتقدم العمر حيث سجلت اعلى نسبة 39% ضمن المجموعة العمرية (20-29) سنة ومن ثم 36% ضمن المجموعة العمرية (30-39).
3. وجود اشارة التهجين الموضعي لدنا الفيروس الحليمي البشري نوع 16 و 18 و 6 و 11 في مجموعة الاورام الحميدة بنسبة اعلى (74%) من وجوده بمجموعة الاورام الخبيثة (61%). وقد كان الفيروس الحليمي البشري 16 هو النوع السائد ومن ثم نوع 18 و 6 و 11 على التوالي في كل من مجموعة الاورام الحميدة (46.4% و 42.9% و 35.7% و 25%) والخبيثة (39.3% و 35.7% و 21.4% و 17.9%) على التوالي.
4. اشارة ال(دنا) للانواع العالية الخطورة للفيروس الحليمي البشري سجلت اعلى نسبة ضمن الدرجة الواطنة وكانت (28.6% و 17.9%) بالنسبة للفيروس الحليمي البشري نوع 16 لكل من مجموعة الاورام الخبيثة والحميدة على التوالي وقد كانت (35.7% و 25%) بالنسبة للفيروس الحليمي البشري نوع 18. اعلى نسبة للفيروس الحليمي البشري نوع 16 ضمن شدة الاشارة العالية (17.8%) في مجموعة الاورام الخبيثة والشدة المتوسطة (21.4%) في مجموعة الاورام الحميدة. اعلى نسبة للفيروس الحليمي البشري 18 سجلت ضمن شدة الاشارة الواطنة (14.3%) في مجموعة الاورام الخبيثة وضمن شدة الاشارة العالية (21.4%) في مجموعة الاورام الحميدة. وقد ظهر فرق معنوي بين مجاميع الدراسة عند مقارنتها وفق درجة الاشارة وشدها.
5. اشارة ال(دنا) للانواع الواطنة الخطورة للفيروس الحليمي البشري سجلت اعلى نسبة ضمن الدرجة العالية (17.9% لكلا النوعين 6 و 11) والشدة العالية (17.9% للفيروس الحليمي البشري نوع 6 و 10.7% للنوع 11) في مجموعة الاورام الحميدة والتي اظهرت فرق معنوي عن مجموعة الاورام الخبيثة والتي اظهرت اعلى نسبة ضمن الدرجة الواطنة (21.4% للفيروس الحليمي البشري نوع 6 و 14.3% للنوع 11) والشدة الواطنة (10.7% لكلا النوعين).
6. الجينات الكابحة للسرطان في اورام المبيض
 - تم تحديد الحامض النووي الرايبوزي الرسول لل(P53) بنسبة 42.9% في مجموعة الاورام الخبيثة وبنسبة 21.4% في مجموعة الاورام الحميدة. ظهر فرق معنوي لاشارة التهجين الموضعي للP53 عند مقارنة نتائج مجاميع الدراسة.
 - تم تحديد الحامض النووي الرايبوزي الرسول لل(Rb) بنسبة 39.3% في مجموعة الاورام الخبيثة وبنسبة 25% في مجموعة الاورام الحميدة. لم يظهر فرق معنوي لاشارة التهجين الموضعي للRB عند مقارنة النتائج بين مجاميع الدراسة.
 - تم تحديد النوع الطافر لل(P53) بتقنية الفحص الكيميائي النسيجي المناعي بنسبة 64.3% في مجموعة الاورام الخبيثة وبنسبة 21.4% في مجموعة الاورام الحميدة. ظهر فرق معنوي لاشارة الفحص الكيميائي النسيجي

- المناعي لوجود بروتين P53 عند مقارنة النتائج بين مجاميع الدراسة وكذلك عند مقارنة شدة ودرجة الاشارة ولم يظهر فرق معنوي عند مقارنة النتائج وفق مرحلة الورم.
7. الارتباط ما بين نتائج التهجين الموضعي ل(دنا) الفيروس الحليمي البشري والجينات الكابحة للسرطان:
- لم يظهر فرق معنوي ما بين نتائج التهجين الموضعي ل(P53) ووجود دنا الفيروس الحليمي البشري 16 و 18 و6 و 11 عند مقارنة النتائج ما بين مجاميع الدراسة بينما كان هناك فرق معنوي ما بين اشارة التهجين الموضعي لل P53 ودنا الفيروس الحليمي البشري نوع 6 في مجموعة الاورام الحميدة. النتائج نفسها ظهرت مع نتائج التهجين الموضعي للرتينوبلاستوما ما عدا وجود فرق معنوي ما بين اشارة دنا الفيروس الحليمي البشري نوع 18 و اشارة التهجين الموضعي للرتينوبلاستوما في مجموعة الاورام الحميدة.
 - لم يظهر فرق معنوي ما بين نتائج الفحص الكيميائي النسيجي المناعي لبروتين ال(P53) ووجود دنا الفيروس الحليمي البشري 16 و 18 و 6 و 11 عند مقارنة النتائج ما بين مجاميع الدراسة. ومن جهة اخرى ظهر فرق معنوي ما بين اشارة دنا الفيروس الحليمي البشري نوع 11 و اشارة الفحص الكيميائي النسيجي المناعي لبروتين ال(P53) في مجموعة الاورام الحميدة.
8. الاصابات المشتركة
- نسبة الاصابات المشتركة للفيروس الحليمي البشري للانواع الواطنة الخطورة 6 و 11 كانت في مجموعة الاورام الحميدة 16.9% اعلى من نسبتها في مجموعة الاورام الخبيثة 7.1%. ظهر فرقا معنويا فقط ما بين مجاميع الدراسة عند وجود الاصابات مشتركة لكل من الانواع عالية الخطورة والواطنة الخطورة للفيروس الحليمي البشري.
 - لم يظهر فرق او ارتباط معنوي ما بين مجاميع الدراسة عند مقارنة وجود الاصابات المشتركة او دنا الفيروس الحليمي البشري للانواع عالية الخطورة او واطنة الخطورة او وجود الاثنين مع نتائج التهجين الموضعي لل(P53). النتائج نفسها ظهرت عند مقارنة نتائج الاصابات المشتركة للفيروس الحليمي البشري ونتائج التهجين الموضعي للرتينوبلاستوما.
 - لم يظهر فرق او ارتباط معنوي ما بين مجاميع الدراسة عند مقارنة وجود دنا الفيروس الحليمي البشري للانواع عالية الخطورة او واطنة الخطورة مع نتائج الفحص الكيميائي النسيجي المناعي لل(P53) بينما كان هناك فرق معنوي بين مجاميع الدراسة عند مقارنة وجود الانواع العالية الخطورة والواطنة الخطورة مع وجود اشارة الفحص الكيميائي النسيجي المناعي لل(P53).

الخلاصة

نتائج هذه الدراسة اظهرت توافقا مع نتائج الدراسات السابقة التي اظهرت دور الاصابة بالفيروس الحليمي البشري في احداث سرطان المبيض او تطوره. ولا بد من اعتبار النتائج المتعلقة بالفيروس الحليمي البشري بهذه الدراسة كملحق للنتائج السابقة ولا يمكن ان تكون نتائج نهائية.

نتائج هذه الدراسة بينت اهمية اجراء الدراسات المستقبلية في المجتمع العراقي لتأكيد دور الفيروس الحليمي البشري بسرطان المبيض وتفاعله مع الجينات الكابحة للسرطان او مع بروتينات خلوية اخرى ولكن مع زيادة حجم العينات