

حضور ویروس پاپیلوما ی انسانی ۱۶ و ۱۸ در زنان مبتلا به سرطان پستان در استان اصفهان

بگاه حسین پوری^۱ ID، فرانک هادی^{۲*} ID، سید حسام‌الدین حجازی^۲ ID، غلامرضا طالعی^۳ ID

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳- دانشیار ویروس‌شناسی، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات هیپاتیت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

یافته / دوره ۲۲ / شماره ۳ / پاییز ۹۹ / مسلسل ۸۵

چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۵/۱۱ پذیرش مقاله: ۹۹/۶/۲۲

مقدمه: در مطالعات مختلف آلودگی ویروسی به عنوان یکی از دلایل سرطان پستان پیشنهاد شده است اما نتایج تحقیقاتی که ارتباط بین ویروس و سرطان را بحث نموده‌اند متناقض است. این مطالعه به منظور بررسی حضور ژنوم HPV16, 18 در نمونه‌های بافتی سرطان پستان در استان اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها: بلوک‌های پارافینه از ۴۰ بافت سرطانی و ۲۰ بافت سالم پستان از زنان استان اصفهان تهیه شدند. پس از استخراج DNA و تکثیر با ژن خانه‌دار بتا‌اکتین به منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌های DNA با کیفیت مناسب برای بررسی حضور DNA ویروس HPV16, 18 با روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس آزمایش شدند. داده‌ها با آزمون کرامر و نرم‌افزار SPSS16 تحلیل شدند.

یافته‌ها: حضور DNA ویروس HPV16 در ۳ مورد از ۴۰ نمونه توموری (۷/۵٪) و DNA ویروس HPV18 در ۸ مورد از ۴۰ نمونه توموری (۲۰٪) مشاهده گردید. در هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد DNA ویروس HPV16, 18 یافت نشد. مقدار ضریب همبستگی کرامر برای HPV16 برابر با ۰/۱۹۷ و سطح معناداری ۰/۰۷۷ و مقدار ضریب همبستگی کرامر برای HPV18 برابر با ۰/۳۳۳ و سطح معناداری ۰/۰۰۳ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در استان اصفهان بین ویروس HPV18 و سرطان پستان در زنان ارتباط معنادار وجود دارد ولی بین ویروس HPV16 و سرطان پستان در زنان ارتباط معناداری وجود ندارد. بنابراین، مطالعات بیشتری در مناطق دیگر برای مشخص کردن مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژی در مورد ارتباط HPV16, 18 و سرطان پستان مورد نیاز است. واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، ویروس پاپیلوما انسانی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، استان اصفهان.

*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

پست الکترونیک: hadi.f@lu.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان از شایع‌ترین بدخیمی‌ها و دومین علت مرگ‌ومیر در بین زنان در کشورهای توسعه‌یافته است (۱). در ایران نیز این سرطان عامل حدود ۲۱٪ از کل بدخیمی‌ها در زنان است (۲). پیشرفت این بیماری با عوامل خطر مختلفی نظیر عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیک مانند جهش در ژن‌های *BRCA1-2* و *TP53*، تراکم بافت پستان، سبک زندگی، استفاده از قرص‌های هورمونی ضدبارداری و مصرف الکل در ارتباط است (۲).

علاوه بر این موارد، ویروس‌ها نیز به عنوان یکی از عوامل محیطی ایجادکننده سرطان گزارش شده‌اند و با بیان انکوژن‌های خود در تنظیم چرخه سلولی اختلال ایجاد کرده، زمینه سرطانی شدن سلول‌ها را فراهم می‌نمایند (۳، ۴). مهم‌ترین DNA ویروس‌هایی که به عنوان سرطانزا در انسان شناخته شده‌اند شامل: اِپِستین-بار، پاپیلوماوی انسانی و تومور موش هستند (۵).

ویروس پاپیلوماوی انسانی انواع مختلفی دارد که قادر به ایجاد عفونت در بسیاری از حیوانات و چندین گونه از پریمات‌ها از جمله انسان هستند (۶، ۷). تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع سروتا‌یپ مختلف پاپیلوماویروس انسانی شناسایی شده است که به دو دسته پرخطر و کم‌خطر تقسیم می‌شوند. دسته کم‌خطر شامل 11، 16، 31، 33، 35، 39، 42، 43، 44، 45، 49، 51، 52، 53، 54، 55، 56، 57، 58، 59، 60، 62، 64، 65، 66، 67، 68، 69، 70، 72، 73، 74، 75، 76، 77، 78، 79، 80، 81، 82، 83، 84، 85، 86، 87، 88، 89، 90، 91، 92، 93، 94، 95، 96، 97، 98، 99، 100، 101، 102، 103، 104، 105، 106، 107، 108، 109، 110، 111، 112، 113، 114، 115، 116، 117، 118، 119، 120، 121، 122، 123، 124، 125، 126، 127، 128، 129، 130، 131، 132، 133، 134، 135، 136، 137، 138، 139، 140، 141، 142، 143، 144، 145، 146، 147، 148، 149، 150، 151، 152، 153، 154، 155، 156، 157، 158، 159، 160، 161، 162، 163، 164، 165، 166، 167، 168، 169، 170، 171، 172، 173، 174، 175، 176، 177، 178، 179، 180، 181، 182، 183، 184، 185، 186، 187، 188، 189، 190، 191، 192، 193، 194، 195، 196، 197، 198، 199، 200، 201، 202، 203، 204، 205، 206، 207، 208، 209، 210، 211، 212، 213، 214، 215، 216، 217، 218، 219، 220، 221، 222، 223، 224، 225، 226، 227، 228، 229، 230، 231، 232، 233، 234، 235، 236، 237، 238، 239، 240، 241، 242، 243، 244، 245، 246، 247، 248، 249، 250، 251، 252، 253، 254، 255، 256، 257، 258، 259، 260، 261، 262، 263، 264، 265، 266، 267، 268، 269، 270، 271، 272، 273، 274، 275، 276، 277، 278، 279، 280، 281، 282، 283، 284، 285، 286، 287، 288، 289، 290، 291، 292، 293، 294، 295، 296، 297، 298، 299، 300، 301، 302، 303، 304، 305، 306، 307، 308، 309، 310، 311، 312، 313، 314، 315، 316، 317، 318، 319، 320، 321، 322، 323، 324، 325، 326، 327، 328، 329، 330، 331، 332، 333، 334، 335، 336، 337، 338، 339، 340، 341، 342، 343، 344، 345، 346، 347، 348، 349، 350، 351، 352، 353، 354، 355، 356، 357، 358، 359، 360، 361، 362، 363، 364، 365، 366، 367، 368، 369، 370، 371، 372، 373، 374، 375، 376، 377، 378، 379، 380، 381، 382، 383، 384، 385، 386، 387، 388، 389، 390، 391، 392، 393، 394، 395، 396، 397، 398، 399، 400، 401، 402، 403، 404، 405، 406، 407، 408، 409، 410، 411، 412، 413، 414، 415، 416، 417، 418، 419، 420، 421، 422، 423، 424، 425، 426، 427، 428، 429، 430، 431، 432، 433، 434، 435، 436، 437، 438، 439، 440، 441، 442، 443، 444، 445، 446، 447، 448، 449، 450، 451، 452، 453، 454، 455، 456، 457، 458، 459، 460، 461، 462، 463، 464، 465، 466، 467، 468، 469، 470، 471، 472، 473، 474، 475، 476، 477، 478، 479، 480، 481، 482، 483، 484، 485، 486، 487، 488، 489، 490، 491، 492، 493، 494، 495، 496، 497، 498، 499، 500، 501، 502، 503، 504، 505، 506، 507، 508، 509، 510، 511، 512، 513، 514، 515، 516، 517، 518، 519، 520، 521، 522، 523، 524، 525، 526، 527، 528، 529، 530، 531، 532، 533، 534، 535، 536، 537، 538، 539، 540، 541، 542، 543، 544، 545، 546، 547، 548، 549، 550، 551، 552، 553، 554، 555، 556، 557، 558، 559، 560، 561، 562، 563، 564، 565، 566، 567، 568، 569، 570، 571، 572، 573، 574، 575، 576، 577، 578، 579، 580، 581، 582، 583، 584، 585، 586، 587، 588، 589، 590، 591، 592، 593، 594، 595، 596، 597، 598، 599، 600، 601، 602، 603، 604، 605، 606، 607، 608، 609، 610، 611، 612، 613، 614، 615، 616، 617، 618، 619، 620، 621، 622، 623، 624، 625، 626، 627، 628، 629، 630، 631، 632، 633، 634، 635، 636، 637، 638، 639، 640، 641، 642، 643، 644، 645، 646، 647، 648، 649، 650، 651، 652، 653، 654، 655، 656، 657، 658، 659، 660، 661، 662، 663، 664، 665، 666، 667، 668، 669، 670، 671، 672، 673، 674، 675، 676، 677، 678، 679، 680، 681، 682، 683، 684، 685، 686، 687، 688، 689، 690، 691، 692، 693، 694، 695، 696، 697، 698، 699، 700، 701، 702، 703، 704، 705، 706، 707، 708، 709، 710، 711، 712، 713، 714، 715، 716، 717، 718، 719، 720، 721، 722، 723، 724، 725، 726، 727، 728، 729، 730، 731، 732، 733، 734، 735، 736، 737، 738، 739، 740، 741، 742، 743، 744، 745، 746، 747، 748، 749، 750، 751، 752، 753، 754، 755، 756، 757، 758، 759، 760، 761، 762، 763، 764، 765، 766، 767، 768، 769، 770، 771، 772، 773، 774، 775، 776، 777، 778، 779، 780، 781، 782، 783، 784، 785، 786، 787، 788، 789، 790، 791، 792، 793، 794، 795، 796، 797، 798، 799، 800، 801، 802، 803، 804، 805، 806، 807، 808، 809، 810، 811، 812، 813، 814، 815، 816، 817، 818، 819، 820، 821، 822، 823، 824، 825، 826، 827، 828، 829، 830، 831، 832، 833، 834، 835، 836، 837، 838، 839، 840، 841، 842، 843، 844، 845، 846، 847، 848، 849، 850، 851، 852، 853، 854، 855، 856، 857، 858، 859، 860، 861، 862، 863، 864، 865، 866، 867، 868، 869، 870، 871، 872، 873، 874، 875، 876، 877، 878، 879، 880، 881، 882، 883، 884، 885، 886، 887، 888، 889، 890، 891، 892، 893، 894، 895، 896، 897، 898، 899، 900، 901، 902، 903، 904، 905، 906، 907، 908، 909، 910، 911، 912، 913، 914، 915، 916، 917، 918، 919، 920، 921، 922، 923، 924، 925، 926، 927، 928، 929، 930، 931، 932، 933، 934، 935، 936، 937، 938، 939، 940، 941، 942، 943، 944، 945، 946، 947، 948، 949، 950، 951، 952، 953، 954، 955، 956، 957، 958، 959، 960، 961، 962، 963، 964، 965، 966، 967، 968، 969، 970، 971، 972، 973، 974، 975، 976، 977، 978، 979، 980، 981، 982، 983، 984، 985، 986، 987، 988، 989، 990، 991، 992، 993، 994، 995، 996، 997، 998، 999، 1000.

در بین انواع پرخطر، HPV16، 18 با ۷۰٪ از سرطان‌های دهانه رحم در ارتباط هستند (۹). ویروس پاپیلوماوی انسانی با بیان پروتئین‌های تنظیمی E6 و E7، عوامل سرکوبگر توموری p53 و P105Rb را مهار می‌نماید و از این رو سبب نامیرا شدن سلول‌ها می‌شود (۱۰). تأثیر این ویروس بر نامیرایی سلول‌های اپی‌تلیال بافت پستان در

آزمایش‌های مختلف مطالعه و تأیید شده است (۱۱). لیکن در مورد نقش این ویروس‌ها در سرطان پستان بحث‌های متناقضی وجود دارد و در مطالعات مختلف نقش انواع پرخطر پاپیلوماویروس را در سرطان پستان از صفر تا ۸۶٪ متغیر گزارش نموده‌اند (۱۲). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط انواع پرخطر پاپیلوما ویروس‌های انسانی ۱۶ و ۱۸ با سرطان پستان در مبتلایان به این بیماری در استان اصفهان در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ با روش PCR بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این پژوهش ۴۰ نمونه بلوک پارافینه بافت سرطان بدخیم پستان و ۲۰ نمونه بلوک پارافینه بافت پستان بدون ضایعه توموری بدخیم (فیبرو آدنوما) به عنوان شاهد توسط بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های آسیب‌شناسی استان اصفهان و پس از تأیید آسیب‌شناس در اختیار ما قرار گرفت. این نمونه‌ها مربوط به سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ بودند و حجم نمونه با در نظر گرفتن $p=0/7$ ، ضریب اطمینان ۹۵ درصد و $d=0/07$ محاسبه گردید.

افراد سالم و بیماران بدون سابقه ابتلا به سرطان‌های دیگر، فاقد درمان‌های مداخله‌ای و بدون مصرف سیگار، مواد مخدر و مشروبات الکلی انتخاب شدند. طیف سنی افراد مورد مطالعه ۳۱ تا ۹۰ سال بود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه فقدان دسترسی به بیماران برای تهیه پرسش‌نامه و بررسی سایر عوامل دخیل در این بیماری بود. پس از تهیه نمونه‌ها و با استفاده از دستگاه میکروتوم (سایلب، انگلستان) برش‌های نازکی به ضخامت ۷ میکرون از بلوک‌های پارافینی تهیه و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری فاقد DNase/RNase ریخته شدند.

استخراج DNA

بعد از پارافین زدایی نمونه‌ها با گزایلن (مرک، آلمان) و اتانول مطلق، DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی (Salting out) استخراج گردید. استخراج از نمونه‌ها با استفاده از بافر لیز کننده (تریس، سدیم کلراید)، EDTA، سدیم دوسیل سولفات، پروتئیناز K (شرکت کیاژن، آلمان)، پنج مولار، ایزوپروپانول سرد، اتانول ۷۰٪، بافر TE با کمک چند مرحله سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ rpm و حمام آب گرم صورت گرفت (۱۳).

بررسی کیفیت و خلوص DNA استخراج شده

غلظت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (بیوتک، آمریکا) تعیین شد. نسبت جذب نوری طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه‌هایی که این نسبت را از ۱/۸ تا ۲ نشان دادند برای انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن بتااکتین انتخاب شدند.

انجام PCR برای بررسی تکثیر ژن خانه‌دار بتااکتین

به منظور تکثیر ژن بتااکتین در DNA نمونه‌های توموری از پرایمرهای جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میکرولیتری شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت و با چرخه دمایی شامل: واسرشت‌سازی ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای مشاهده باند ۱۶۱ جفت بازی الکتروفورز شدند.

انجام PCR برای بررسی حضور ژن ویروس

HPV16, 18

تمام نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن بتااکتین، برای شناسایی و تشخیص DNA ویروس HPV16, 18 مجدداً PCR شدند. در این مرحله به منظور تشخیص حضور ژن ویروس HPV16, 18 پرایمرهای اختصاصی این ویروس‌ها نیاز است. توالی این پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش PCR مجدداً در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میکرولیتری در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری و با چرخه دمایی شامل: واسرشت‌سازی ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۴/۸ برای HPV16 و ۵۵ برای HPV18 به مدت ۱ دقیقه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل ۱/۵ درصد برای مشاهده باند ۱۲۰ جفت بازی برای HPV16 و ۴۱۵ جفت بازی برای HPV18 الکتروفورز شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی به کاررفته در این پژوهش

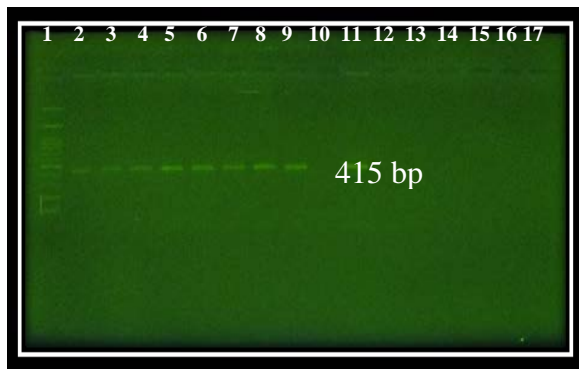
منبع	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر (۵'→۳')	اختصاصیت
(۱۴)	۱۶۱	F: AGACGCAGGATGGCATGGG R: GAGACCTCAACACCCCAGCC	بتااکتین
(۱۵)	۱۲۰	F: TCA AAA GCC ACT GTG TCC TG R: CGT GTT CTT GAT GAT CTG CA	HPV16
(۱۶)	۴۱۵	F: ATAGCAATTTTGATTTGTC R: AAACCTATCCAAAATATG	HPV18

تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار (IBM, USA) SPSS16 و شدت همبستگی با روش آزمون کرامر بررسی شد. سطح اطمینان ۹۵٪ و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

طیف سنی افراد مورد مطالعه ۳۱ تا ۹۰ سال بود که به سه گروه سنی ۵۰-۳۱، ۷۰-۵۱ و ۹۰-۷۱ تقسیم



تصویر ۳. الگوی الکتروفورز محصول PCR بافت توموری با پرایمر اختصاصی ویروس HPV18، چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی، چاهک‌های ۲-۹: نمونه‌های توموری که دارای ژنوم ویروس HPV18 بودند، چاهک ۱۰: کنترل منفی (آب)، چاهک ۱۱: کنترل مثبت، چاهک‌های ۱۲-۱۷: نمونه‌های سالم.

فراوانی حضور ژنوم ویروس‌های 18، 16 HPV در نمونه‌های سرطانی و غیر سرطانی در جدول ۲ آمده است. مقدار ضریب همبستگی کرامر برای HPV16 برابر با ۰/۱۹۷ و سطح معناداری ۰/۰۷۷ محاسبه گردید؛ بنابراین بین نتیجه آزمون و گروه‌های مورد بررسی ارتباط معنادار وجود نداشت. مقدار ضریب همبستگی برای HPV18 برابر با ۰/۳۳۳ و سطح معناداری ۰/۰۰۳ به دست آمد بنابراین بین نتیجه آزمون و گروه‌های مورد مطالعه ارتباط معنادار وجود داشت.

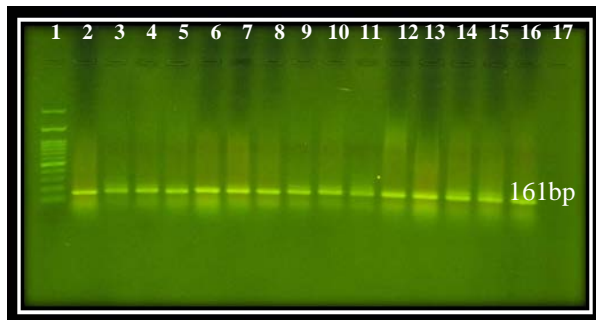
جدول ۲. میزان حضور DNA ویروس‌های 18، 16 HPV در نمونه‌های سرطانی و غیر سرطانی

نوع ویروس HPV	نمونه سالم (۲۰ مورد)	نمونه سرطانی (۴۰ مورد)
HPV16	-	۳ (۷/۵)
HPV18	-	۸ (۲۰٪)
HPV16, 18	-	۲ (۵٪)

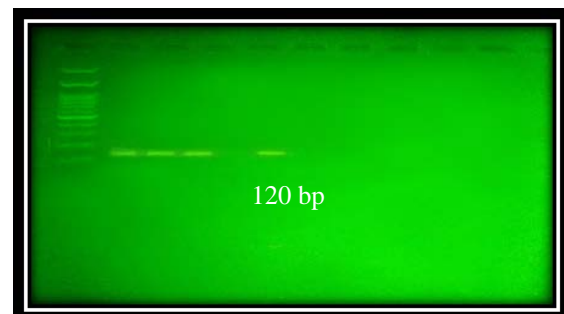
بحث و نتیجه‌گیری

ارتباط HPV و سرطان پستان اولین بار در سال ۱۹۹۲، توسط Di Ionardo و همکاران مطرح شد. آنها DNA مربوط به HPV16 را در ۲۹/۴٪ از ۱۷ نمونه سرطان پستان به روش PCR مشاهده کردند (۱۷). به

شدند. بیشترین تعداد افراد سرطانی مربوط به افراد ۷۰-۵۱ ساله بود. تعداد بیماران مبتلا به سرطان مجرای ۳۳ و تعداد بیماران مبتلا به سرطان لوبولار ۷ نفر بود. پس از استخراج DNA از بافت‌های سرطانی و غیر سرطانی جذب همه نمونه‌ها بین ۱/۸ تا ۲ به دست آمد؛ بنابراین، از لحاظ کیفی مناسب بودند و ژن بتا‌اکتین را در ضمن PCR تکثیر نمودند و بعد از الکتروفورز روی ژل آگارز باند ۱۶۱ جفت بازی مشاهده شد (تصویر ۱).



تصویر ۱. الگوی الکتروفورز محصول PCR ژن بتا‌اکتین در نمونه‌های توموری و شاهد. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های ۲-۱۱: نمونه‌های توموری، چاهک‌های ۱۲-۱۶: نمونه‌های سالم، چاهک ۱۷: کنترل منفی (آب). نتایج حاصل از PCR با DNA ژنومی مربوط به نمونه‌های سرطانی و شاهد با کمک پرایمرهای اختصاصی ویروس HPV16, 18 نشان داد که از ۴۰ نمونه توموری ۳ مورد از نظر HPV16 (۷/۵٪) و ۸ مورد از نظر HPV18 (۲۰٪) مثبت بودند و از نمونه‌های شاهد هیچ مورد مثبتی رؤیت نشد (تصویر ۲ و ۳).



تصویر ۲. الگوی الکتروفورز محصول PCR بافت توموری با پرایمر اختصاصی ویروس HPV16، چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی، چاهک‌های ۲-۴: نمونه‌های توموری دارای ژنوم ویروس HPV16، چاهک ۵: کنترل منفی (آب)، چاهک ۶: کنترل مثبت، چاهک‌های ۷-۱۱: نمونه‌های سالم.

بررسی و ۱۸ مورد مثبت مربوط به HPV18, 33 گزارش شد ولی ویروس را در هیچ کدام از نمونه‌های غیرسرطانی ندیدند (۲۵). در تحقیقی ویروس HPV در ۶۱/۰۶ درصد زنان سوری‌های مبتلا به سرطان پستان گزارش شد؛ فراوان‌ترین نوع ویروس ۳۳ و ۳۵ بود اما حضور نوع ۱۶ و ۱۸ به ترتیب در ۸/۸۴ و ۹/۷۳ درصد بیماران مشاهده شد (۲۶). گروه تحقیقاتی دیگری وجود ویروس HPV 11, 16, 18, 33 را در ۵۰ نمونه بافت سرطان پستان در کشور ترکیه آزمایش نمودند که در نتیجه ویروس HPV18 در ۲۰ مورد و HPV33 در ۳۵ مورد بافت توموری مشاهده شد (۲۷). در عراق نیز علی و همکاران حضور ویروس HPV را در ۱۲۷ بافت سرطانی ۴۹٪ مثبت گزارش کردند که شایع‌ترین ویروس‌ها مربوط به انواع ۱۶، ۱۸ و ۳۳ بود (۲۸). در شمال ایران نیز سیگارودی و همکاران ۷۹ نمونه بافت سرطان پستان و ۵۱ نمونه غیرسرطانی را مطالعه نمودند و حضور HPV را در ۲۵/۹٪ از نمونه‌های سرطانی و ۲/۱٪ از نمونه‌های غیر سرطانی رؤیت نمودند. آنها HPV16, 18 را به عنوان فراوان‌ترین سروتایپ در نمونه‌های سرطانی و HPV124 را به عنوان تنها سروتایپ در نمونه‌های غیرسرطانی گزارش نمودند. نتایج آنها تأییدکننده ارتباط HPV و سرطان پستان در ایران بوده است (۲۹). در برخی مطالعات دیگر نیز حضور این ویروس‌ها در بافت‌های سرطانی مثبت بود اما رابطه معناداری برای آنها مشاهده نشد؛ در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط اسکویی و آهنگر روی ۶۵ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام شد، ۲۲ نمونه را از نظر حضور ژنوم HPV مثبت اعلام نمودند. آنها شیوع DNA-HPV6 را از سایر سروتایپ‌ها بیشتر و تعداد اندکی از نمونه‌ها را از نظر حضور HPV 11, 16, 35, 52 مثبت گزارش کردند، با این حال نتایج آنها تأییدکننده معنادار بودن ارتباط انواع پرخطر پاپیلوما ویروس با سرطان پستان نبود (۳۰). در تحقیقات مندی‌زبل-رویز و همکاران روی ۶۷ بیمار

دنبال آن محققین دیگر در کشورهای مختلف حضور ویروس HPV را در نمونه‌های سرطانی و غیرسرطانی پستان بررسی و مقایسه نمودند؛ تعداد زیادی از این مطالعات حضور ویروس HPV را در نمونه‌های سرطانی بیشتر از نمونه‌های سالم و خوش‌خیم مثبت اعلام نمودند (۱۸)؛ از این رو عفونت با ویروس HPV را با ایجاد سرطان پستان مرتبط دانستند. البته نوع ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف، یکسان گزارش نشده است. کان و همکاران در استرالیا، ۵۰ نمونه سرطان پستان را با روش PCR از نظر حضور HPV16, 18, 33 ارزیابی و تنها ژنوم HPV18 را در ۲۴ مورد گزارش نمودند (۱۹). در ایالات متحده آمریکا در ۶ نمونه از ۱۷ مورد مبتلا به سرطان پستان، DNA مربوط به HPV16, 18 و احتمالاً HPV11 دیده شد (۲۰). در برزیل با استفاده از طراحی دو جفت پرایمر اختصاصی ناحیه E6، حضور ویروس‌های HPV16 و HPV18 در ۱۰۱ بلوک بافت پارافینه بیماران سرطانی بررسی شد. ویروس در ۲۵ بیمار کارسینومای پستان مشاهده شد که ۱۴ مورد HPV16 و ۱۰ مورد HPV18 بودند. ولی در ۲۱ مورد بافت خوش‌خیم هیچ ویروسی وجود نداشت (۲۱). در مطالعه‌ای که روی ۵۱ زن مبتلا به سرطان پستان در مکزیک صورت گرفت، ۱۰ مورد HPV16، ۳ مورد HPV18 و ۲ مورد از نظر هر دو ویروس مثبت اعلام شد. در استرالیا ۸ مورد از ۲۸ نمونه سرطانی و ۳ مورد از ۲۶ نمونه غیرسرطانی مورد آزمایش از نظر ویروس HPV16, 18 مثبت دیده شد (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط دلگادو و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی ۲۵۱ بیمار اسپانیایی انجام شد، ۵۱/۸٪ از بیماران از نظر ویروس HPV به خصوص HPV16 مثبت بودند (۲۳). همین‌طور حضور HPV16 در ۱۹ مورد از ۴۱ بیمار نروژی و ایتالیایی با کارسینوم پستان که سابقه ضایعات اپی‌تلیالی رحمی را داشتند، مثبت گزارش شد (۲۴). در آسیا ارتباط بین HPV33, 16, 18 و سرطان پستان روی ۷۲ بیمار

شده است در حالی که ویروس‌های مختلفی در ایجاد سرطان پستان دخیل هستند. به همین منظور در این تحقیق از نمونه‌های استان اصفهان استفاده گردید که در سال ۲۰۱۸ به بررسی ویروس EBV در این نمونه‌ها پرداخته و ارتباط بین ویروس و سرطان معنادار گزارش شده بود. هم‌زمان با آن در نمونه‌های مربوط به استان‌های لرستان و اصفهان رابطه ویروس EBV و سرطان نیز مطالعه شد که در لرستان معنادار و اصفهان بی‌معنی به دست آمد (۱۳، ۴۲، ۴۳). در مطالعه حاضر زمانی که حضور ویروس پاپیلوما نوع ۱۶ و ۱۸ در نمونه‌های بافت سرطان پستان در استان اصفهان سنجیده شد نتایج حاکی از ارتباط معنادار ویروس پاپیلوما ۱۸ و فقدان ارتباط معنادار ویروس پاپیلوما ۱۶ با ایجاد سرطان پستان بود؛ بنابراین این‌گونه به نظر می‌رسد که حداقل حضور یک ویروس یکی از علل ایجادکننده سرطان پستان باشد که طبعاً مطالعات بیشتری برای تأیید آن باید صورت بگیرد. لذا با به‌کارگیری روش‌های مولکولی در کنار سایر روش‌ها و انتخاب جامعه آماری بالاتر، می‌توان توزیع متفاوت اپیدمیولوژی این ویروس را در استان‌ها یا قومیت‌های مختلف ایران جداگانه بررسی و جمعیت‌های پرخطر را شناسایی نمود. سپس با راهکارهای مناسب پیشگیری اولیه مانند واکسیناسیون علیه HPV می‌توان از پیشرفت این سرطان جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه لرستان است. از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های استان اصفهان که نمونه‌ها را در اختیار ما قرار دادند، بیمارانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند و هم‌چنین از دانشگاه لرستان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

مکزیکی مبتلا به سرطان پستان و ۴۰ نمونه بافت غیرسرطانی تنها ۳ مورد از انواع HPV16,18,33 را مثبت گزارش نمودند (۳۱). در مطالعه‌ای در کشور کره جنوبی، ۸ مورد از ۱۲۳ نمونه سرطانی و ۲ مورد از ۳۱ نمونه غیر سرطانی مورد آزمایش از نظر حضور ویروس‌های HPV16, 18, 58 مثبت دیده شدند ولیکن ارتباط ویروس و سرطان سینه معنادار اعلام نشد (۳۲). بنابراین در بیشتر مواردی که حضور ویروس HPV در بافت‌های سرطانی مثبت بوده است، HPV16, 18 جزء شایع‌ترین بودند (۳۳)؛ لذا در مطالعه حاضر نیز با روش PCR وجود پاپیلوماویروس نوع ۱۶ و ۱۸ در نمونه‌های بافت سرطانی و غیرسرطانی در استان اصفهان آزمایش گردید، حضور ژنوم ویروس HPV18 در ۸ مورد و HPV16 در ۳ مورد از ۴۰ نمونه توموری تأیید شد و در نمونه‌های سالم ویروس دیده نشد؛ البته فقط ارتباط ویروس پاپیلوما ۱۸ با ایجاد سرطان پستان معنادار بود و در مورد ویروس ۱۶ ارتباط معنادار به دست نیامد. به نظر می‌رسد عفونت با انواع HPV پرخطر ۱۶ و ۱۸ می‌تواند تهاجم سلولی و متاستاز را در سرطان پستان از طریق افزایش بیان یک عامل رونویسی به نام Id2 القا نماید (۲۶ و ۲۷).

البته برخلاف موارد بالا که ویروس HPV در بافت‌های سرطانی مثبت گزارش شده است، موارد مختلفی نیز حاکی از نبود ویروس HPV در نمونه‌های بافت سرطان پستان در مناطق مختلف وجود دارد. برای مثال در ۱۲۳ بیمار تونسی (۳۴)، ۸۱ بیمار سوئیسی (۳۵)، ۲۵۲ بیمار هندی (۳۶)، ۵۰ بیمار فرانسوی (۳۷)، ۱۱۸ بیمار مکزیکی (۳۸)، ۷۹ بیمار اسپانیایی (۳۹) و ۲۳۱ بیمار شمال ایران (۴۰) هیچ نمونه مثبتی از ویروس HPV گزارش نشد. به نظر می‌رسد علت این تناقضات تفاوت در روش‌های به کار رفته در شناسایی ویروس و یا اختلاف در تجزیه و تحلیل داده‌ها باشد (۴۱). همین‌طور در هرکدام از مطالعات تنها به بررسی حضور یک ویروس پرداخته

References

1. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. "Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016; 66(1): 31-42
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2005; 55(2): 74-108.
3. Liao HC, Tsai JH. Data mining for DNA viruses with breast cancer, fibroadenoma, and normal mammary tissue. *Applied Mathematics and Computation*. 2007; 188(1): 989-1000.
4. Amarante MK, Watanabe MAE. The possible involvement of virus in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2009; 135(3): 329-337.
5. Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumour Virus as Multiple Viruses in Breast Cancer. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48788
6. Campo MS. Bovine papillomavirus and cancer. *Veterinary Journal*. 1997; 154(3): 175-188.
7. Campo MS. Bovine papillomavirus and cancer. *The Veterinary Journal*. 1997; 154(3): 175-188.
8. Hildesheim A. Human papillomavirus variants: implications for natural history studies and vaccine development efforts. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997; 89 (11): 752-753.
9. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2010; 94.
10. Wright T, Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A. HPV DNA Testing of Self-Collected Vaginal Samples Compared With Cytologic Screening To Detect Cervical Cancer. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2001; 5(1): 57-58.
11. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(9): 690-698.
12. Simões PW, Medeiros LR, Pires PDS, Edelweiss MI, Rosa DD, Silva FR, et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: A systematic review. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2012; 22(3): 343-347.
13. Saeedi Z, Hadi F, Hejazi SH, Salahshournia Z. The relationship between EBV virus and breast cancer in Khuzestan Province of Iran. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2018; 5(1): 37-41. (In Persian)
14. Ahangari G. Effect of Hyperlipidemia on Cell Mediated Immunity; Could it be as Predisposing Factor of Cancer Risk.

- Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 2018; 12(3).
15. Buchwald C, Franzmann MB, Jacobsen GK, Lindeberg H. Human papillomavirus (HPV) in sinonasal papillomas: A study of 78 cases using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. 1995; 105(1): 66-71.
 16. Raji N, Sadeghizadeh M, Tafreshi KN, Jahanzad E. Detection of human papillomavirus 18 in cervical cancer samples using PCR-ELISA (DIAPOPS). *Iranian Journal of Microbiology*. 2011; 3(4): 177-182.
 17. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1992; 21(2): 95-100.
 18. Bae JM, Kim EH. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: A meta-analysis of case-control studies. *Infectious Agents and Cancer*. 2016; 11(1).
 19. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2005; 93(8): 946-948.
 20. Liu Y, Klimberg VS, Andrews NR, Hicks CR, Peng H, Chiriva-Internati M, et al. Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *Journal of Human Virology*. 2001; 4(6): 329-334.
 21. Damin APS, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre COP. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004; 84(2): 131-137.
 22. Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2009; 101(8): 1345-1350.
 23. Delgado-García S, Martínez-Escoriza JC, Alba A, Martín-Bayón TA, Ballester-Galiana H, Peiró G, et al. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: A Spanish case-control study. *BMC Cancer*. 2017; 17(1).
 24. Hennig EM, Kvinnsland S, Holm R, Nesland JM. Significant difference in p53 and p21 protein immunoreactivity in HPV 16 positive and HPV negative breast carcinomas. *Acta Oncologica (Madr)*. 1999; 38(7): 931-938.
 25. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, et al. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Research*. 1999; 19(6 B): 5057-5061.
 26. Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: A tissue microarray study. *British Journal of Cancer*. 2008; 99(3): 404-407.
 27. Gumus M, Yumuk PF, Salepci T, Aliustaoglu M, Dane F, Ekenel M, et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients normal and tumoral tissue samples. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2006; 25(4): 515-5121.

28. Ali SHM, Al-Alwan NAS, Al-Alwany SHM. Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2014; 20(6): 372-377.
29. Sigaroodi A, Nadji SA, Naghshvar F, Nategh R, Emami H, Velayati AA. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012: 837191
30. Ahangar-Oskouee M, Shahmahmoodi S, Jalilvand S, Mahmoodi M, Ziaee AA, Esmaeili HA, et al. No detection of "High-risk" human papillomaviruses in a group of Iranian women with breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(9): 4061-4065.
31. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramírez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2009; 114(1): 189-194.
32. Choi Y La, Cho EY, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, et al. Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumor Biology*. 2007; 28(6): 327-332.
33. Lawson JS, Glenn WK, Whitaker NJ. Human papilloma viruses and breast cancer - assessment of causality. *Frontiers in Oncology*. 2016; 7(Sep).
34. Hachana M, Ziadi S, Amara K, Toumi I, Korbi S, Trimeche M. No evidence of human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. *Breast*. 2010; 19(6): 541-544.
35. Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: No evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast*. 2007; 16(2): 172-177.
36. Hedau S, Kumar U, Hussain S, Shukla S, Pande S, Jain N, et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: No evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer*. 2011;11.
37. De Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X. No evidence of Human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):55-58.
38. Herrera-Romano L, Fernández-Tamayo N, Gómez-Conde E, Reyes-Cardoso JM, Ortiz-Gutierrez F, Ceballos G, et al. Absence of human papillomavirus sequences in epithelial breast cancer in a Mexican female population. *Medical Oncology*. 2012; 29(3): 1515-1517.
39. Vernet-Tomas M, Mena M, Alemany L, Bravo I, De Sanjosé S, Nicolau P, et al. Human papillomavirus and breast cancer: No evidence of association in a spanish set of cases. *Anticancer Research*. 2015; 35(2): 851-856.
40. Moradi A, Mobasheri E, Tabarraei A, Bakhshandeh Nosrat S, Kazeminejad V, Azarhosh R, et al. Molecular epidemiology of Human Papillomaviruses in breast

- cancer. Medical Laboratory Journal. 2009; 3(1): 9-14.
41. Murray PG. Epstein-Barr virus in breast cancer: Artefact or aetiological agent? Journal of Pathology. 2006; 209(4): 427-429.
42. Salahshornia Z, Hejazi SH, Hadi F, Saeedi Z. The Study of Relationship Between Epstein - Barr virus and Breast Cancer in Isfahan Province. Iranian Journal of Breast Disease. 2018; 11(02): 16-24.
43. Hejazi H, Hejazi SH, Taleii G. Study on the association of Epstein - Barr virus with breast cancer in Khorramabad breast cancer patients, Iran. 2019; Yafteh 21(1): 89-98 (In persian).

Presence of Human Papillomavirus -16 and -18 Among Women with Breast Cancer in Isfahan Province

Hosseinpouri P¹, Hadi F^{*2}, Hejazi SH², Talei GR³

1. MSc of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran,

2. Assistant Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran. hadi.f@lu.ac.ir

3. Associate Professors of Virology, Department of Virology, Hepatitis Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Received: 1 Aug 2020

Accepted: 12 Sep 2020

Abstract

Background: Various studies proposed virus infection is to be a possible cause of human breast cancer. However, the data argue the association between virus and cancer are inconsistent. This study was conducted to detect whether HPV-DNA is present in tissue samples of breast cancer in Isfahan province.

Materials and Methods: Paraffin embedded formalin fixed specimens were prepared from 40 breast tumor and 20 healthy tissues in women with breast cancer from Isfahan province. After DNA extraction and amplification of beta-actin housekeeping gene for evaluation of DNA purity, all DNA samples with appropriate purity were examined for detection of DNA-HPV by polymerase chain reaction (PCR) using virus specific primers. Data was analyzed with Cramer test using SPSS16.0 software.

Result: Presence of DNA-HPV 16 in 3 out of 40 cases (5.7%) and DNA-HPV18 in 8 out of 40 (20%) cases of breast cancer samples was observed and DNA-HPV18. DNA-HPV 16 and 18 were detected in none of the 20 control samples. Statistically, Cramer's index for HPV16 infection was 0.197 and Sig=0.077 in cancer samples, and Cramer's index for HPV18 infection was 0.333 and Sig=0.003 in cancer samples.

Conclusion: Therefore, in Isfahan province, HPV18 is meaningful associated with breast cancer in women and HPV16 is not meaningful associated with breast cancer in women. Further studies in other regions are needed to clarify the underlying pathophysiological mechanisms behind the association of HPV16, 18 infection and breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Human Papilloma virus, PCR

***Citation:** Hosseinpouri P, Hadi F, Hejazi SH, Taleii Gh. Presence of Human Papillomavirus -16 and -18 Among Women with Breast Cancer in Isfahan Province. *Yafte*. 2019; 21(3):84-94.