

مطالعه ارتباط بین پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) با سرطان پستان در
بیماران ایرانیزهرا طهماسبی فرد^۱، افشین عبدی راد^۲، مینو ساعتیان^۳، لیلا عارفیان^۴^۱ استادیار، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن^۲ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران^۳ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران^۴ پاتولوژیست، متخصص پاتولوژی بالینی و تشریحی بیمارستان سیزده آبان، تهران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس‌هایی نظیر پاپیلوما ویروس انسانی در بافت‌های خوش‌خیم و سرطانی پستان شناسایی شده‌اند و به عنوان اتیولوژی سرطان پستان در نظر گرفته شده‌اند، اما اطلاعات بحث برانگیزی در مورد القاء ویروسی سرطان پستان وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی حضور پاپیلوما ویروس انسانی در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، بخش‌هایی از بلوک‌های پارافینی از ۶۴ بیمار زن با سرطان پستان و ۵۳ بافت پستان از بیماران با بیماری فیبروسیستیک به عنوان شاهد، از نظر حضور HPV DNA بررسی شدند. *Real-Time PCR* برای تکثیر سکانس‌های حفظ شده *GP5+/GP6+* از ویروس HPV استفاده شد.

یافته‌ها: توالی‌های HPV DNA در ۳ تا از ۵۳ نمونه بافت خوش‌خیم پستان یافت شد ولی در هیچکدام از نمونه‌های سرطان پستان شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نمی‌تواند تایید کننده نقش HPV در سرطان پستان باشد.

واژگان کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی، سرطان پستان، *Real-Time PCR*

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در دنیا می‌باشد. این سرطان معضل بهداشتی در کل دنیا بوده و عامل اصلی مرگ و میر در بین زنان به حساب می‌آید. فاکتورهای متعددی نظیر سن، طول مدت دوره تولید مثل، نازایی، چاقی و غیره در این ارتباط شناخته شده‌اند (۱). این سرطان از لحاظ بالینی یک بیماری هتروژنوس بوده که عمدتاً به خاطر طیف وسیعی از تغییرات ژنتیکی نظیر از دست دادن یا به دست آوردن

کروموزوم (یا کروموزوم‌ها)، بازآرایی ژنومی و موتاسیون‌ها روی می‌دهد. از بررسی مجموعه ژنوم بافت‌های سرطانی، اطلاعات بی‌نهایت زیادی حاصل می‌شود که می‌توان از آنها برای شناسایی فاکتورهای تشخیصی و پیشگیری موفقیت‌آمیز استفاده نمود با این وجود محدودیت‌هایی در استفاده از درمان‌های مولکولی موثر مورد نظر نیز وجود دارد (۲).

سرطان پستان یک بیماری چند مرحله‌ای است و عفونت با DNA ویروس‌ها می‌تواند در یک یا چند مرحله از فرایند بیماری‌زایی آن دخیل باشد (۳ و ۴). پاپیلوما ویروس‌های انسانی احتمالاً در پیشرفت سرطان پستان نقشی بازی می‌کنند. فرضیه‌ای که HPV در ایجاد آدنوکارسینومای پستان می‌تواند دخیل باشد از آزمایشاتی حاصل شد که در آن رده سلولی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، دکتر زهرا طهماسبی فرد

(email: Ztahnasebi@riau.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱۳

شمسی بودند و افراد جراحی شده میانگین سنی ۴۸ سال (حداقل ۳۳ سال و حداکثر ۵۶ سال) را داشتند. طیف سنی افراد نرمال انتخاب شده نیز در طیف سنی موارد سرطانی قرار داشت.

با استفاده از دستگاه میکروتوم، برش‌های بسیار نازک ۱۰ میکرونی به تعداد ۴ عدد از بلوک‌های پارافینی تهیه شد و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف فاقد DNase/RNase ریخته شد. برای هر نمونه از دستکش یک بار مصرف، تیغ و اپلیکاتور نو استفاده گردید.

بعد از دپارافینه کردن با Xylene و اتانول مطلق، DNA با استفاده از کیت استخراج Roche-Diagnostics Indianapolis، IN مطابق با دستور کار ارائه شده توسط شرکت استخراج گردید. روش استخراج به این ترتیب بود که ابتدا بافت‌های دپارافینه در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده بافت، ۱۶ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا بافت کاملاً لیز شود. بعد از افزودن ۳۲۵ میکرولیتر Binding Buffer و ۳۲۵ میکرولیتر اتانول مطلق مخلوط بر روی ستون برده شد. سپس سه بار شستشو برای برداشتن مواد اضافی به کمک بافر شستشو انجام گرفت. DNA چسبیده به ستون با ۵۰ میکرولیتر بافر Eluted شستشو داده شد و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در مطالعه حاضر با روش Real-Time PCR و با استفاده از رنگ فلورسنتی سبز بنام SYBR Green I تمامی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. این رنگ فلورسنتی قادر است در شیار کوچک DNAی دو رشته‌ای قرار گرفته و نور فلورسنتی را ساطع نماید. میزان نور تولید شده نسبت مستقیم با میزان محصول PCR دارد. مولکول SYBR Green I اثر مهار کنندگی بر PCR نداشته و از آن می‌توان به جای پروب‌های اختصاصی فلورسنت استفاده نمود.

برای ارزیابی درستی استخراج DNA، ابتدا تمامی نمونه‌های برای ژن انسانی HMBS (Homo sapiens HMBS hydroxymethylbilane synthase; GenBank accession no. M95623.1) به عنوان کنترل داخلی با پرایمرهای اختصاصی آن PCR شدند (۱۰). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آن با حجم ۲۰ میکرولیتری، حاوی ۰/۲ میکرومول از هر یک از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) HMBS (۱ میکرولیتر از هر یک)، ۰/۱ میکرومول DNA الگو (۵ میکرولیتر) و ۱۰ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix (Takara Bio, Ostu, Shiga, Japan) و بقیه آب مقطر

پستان انسان، پس از انتقال ژنوم کامل HPV نوع ۱۶ و ۱۸ نامیرا گردید. با این وجود هیچ مدرکی دال بر اینکه HPV می‌تواند بافت پستان انسان را در بدن آلوده کند، وجود ندارد (۵).

پاپیلوما ویروس‌ها (PVs) گروه کوچکی از ویروس‌های بدون پوشش با DNA دو رشته‌ای هستند که جزء خانواده پاپیلوما ویروس می‌باشند. این ویروس‌ها اپی‌تلیال سنگفرشی را در نواحی مختلف آلوده می‌کنند (۶). بر طبق اطلاعات موجود تقریباً ۲۰۰ نوع پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) شناخته شده است (۷).

HPVها سبب ایجاد طیفی از ضایعات هایپرپلازی اپی‌تلیال شده و در دو گروه مخاطی و جلدی دسته‌بندی می‌شوند. این گروه‌ها بسته به قدرت ضایعه در ایجاد بدخیمی پیشرونده، به دو گروه کم‌خطر و پرخطر تقسیم بندی می‌شوند. HPVهای مخاطی کم‌خطر نظیر HPV-6 و HPV-11 زگیلهای تناسلی را ایجاد می‌کنند، در حالی که HPVهای مخاطی پرخطر نظیر HPV-16 و HPV-18 سبب ایجاد ضایعات درون اپی‌تلیالی سنگفرشی شده و می‌توانند تا مرحله سرطان سلول سنگفرشی مهاجم نیز پیشروی کنند. HPVها با بدخیمی‌های دهانی و دستگاه تناسلی مرتبط هستند. در حقیقت بیش از ۹۹٪ از موارد سرطان رحم، توسط HPVهای پرخطر روی می‌دهند (۸).

مطالعات بالینی اطلاعات بحث برانگیزی در مورد حضور HPV در سرطان پستان ارائه کرده است. مطالعات اروپایی‌ها عمدتاً بر روی انواع HPV ۱۶ و ۱۸ متمرکز شده، در حالی که اطلاعات به دست آمده از زنان ژاپنی و چینی، شواهدی از ارتباط سرطان پستان با انواع نادر HPV نظیر HPV-33 را نشان می‌دهد (۹).

هدف از این مطالعه بررسی حضور پاپیلوما ویروس انسانی در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان بود.

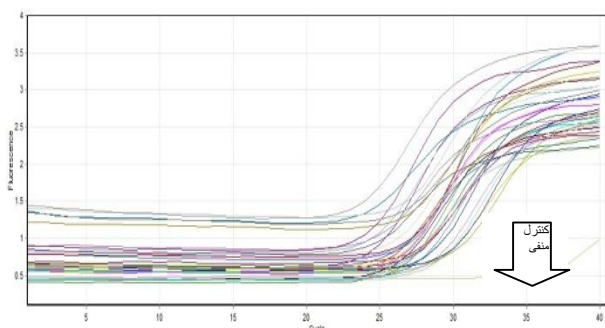
مواد و روشها

۶۶ نمونه بلوک پارافینه سرطان پستان و ۵۴ نمونه بلوک پارافینه بافت غیر سرطانی پستان (فیبروسیستیک) از بیمارستان‌های امام خمینی، بوعلی و ۱۳ آبان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های غیرسرطانی مربوط به افرادی بودند که توسط پاتولوژیست‌های محترم تشخیص داده شده و این افراد به هیچ نوع بدخیمی در هیچ جای دیگر بدن مبتلا نبودند. بلوک‌های انتخاب شده مربوط به سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۹

پرایمرها و پروبها برای هر دوی ژنهای کنترلی و مورد هدف از کمپانی Bioneer (Alameda, CA) خریداری شده بود. توالی آنها مطابق با جدول ۱ می باشد.

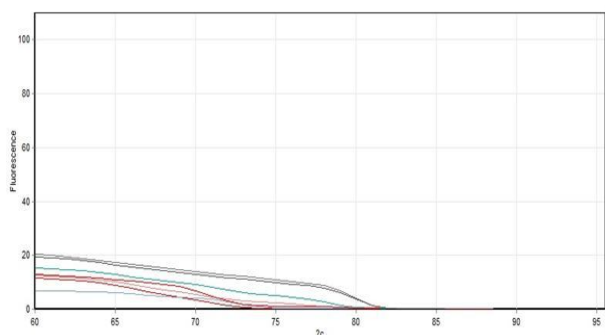
یافته ها

از ۶۶ نمونه بلوک پارافینه سرطان پستان و ۵۴ نمونه بلوک پارافینه بافت غیر سرطانی پستان (فیبروسیتیک)، پس از استخراج DNA و انجام RCR برای ژن HMBS، دو نمونه سرطانی و ۱ نمونه غیر سرطانی مناسب نبودند و کنار گذاشته شدند. نتایج تکثیر ژن HMBS در تعدادی از نمونه ها در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- نتایج تکثیر ژن HMBS از DNA استخراج شده از تعدادی بیمار به همراه کنترل منفی

برای تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرهای HPV L1، از شش نمونه DNA استخراج شده از بافت های سرطان رحم آلوده به HPV-16 استفاده شد. برای اطمینان از نوع ویروس ژنوم آنها تعیین توالی شده بود. در شکل ۲ دمای بهینه برای شش نمونه HPV، ۶۰ درجه سانتی گراد تعیین شد.



شکل ۲- ارزیابی دمای بهینه اتصال پرایمرهای HPV L1 در شش نمونه کنترل مثبت HPV-16.

نمونه های مثبت برای ژن HMBS انتخاب شدند و با پرایمرهای اختصاصی ژن HPV L1، در چهار مرحله همراه با

تهیه شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه نیز به این صورت تنظیم شد. دنا توره شدن اولیه مولکول های DNA الگو در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه سپس ۴۰ چرخه تکراری ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۴ ثانیه انجام گرفت. در انتهای چرخه های تکثیر، منحنی دمای ذوب به منظور بررسی اختصاصی بودن قطعه تکثیر یافته رسم شد. برای تکثیر توالی ژن هدف HPV L1 از یک مخلوط واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرومول از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس GP5+/GP6+ (۱ میکرولیتر از هر یک (۱۱)، ۰/۱ میکرومول DNA الگو (۵ میکرولیتر) و ۱۰ میکرولیتر SYBR-Green PCR Master Mix و بقیه آب مقطر استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی برای تکثیر بصورت دنا توره اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۰/۵ دقیقه و سپس ۴۵ چرخه Touchdown با ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ثانیه، ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۴ ثانیه انجام گرفت. مرحله اتصال به صورت Touch down از دمای ۶۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد برای هر سیکل ۰/۵ درجه سانتی گراد کاهش تنظیم شده بود. سپس در چرخه نهایی دما ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شدند تا ساخت رشته ها به طور کامل انجام شود. منحنی ذوب با گرم نگه داشتن محصولات PCR از دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تا ۹۵ درجه سانتی گراد به نسبت ۱ درجه سانتی گراد در هر ثانیه رسم شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای HMBS و GP5+/GP6+

Primer	Sequence 5'-3'	Size (bp)
GP5+/GP6+	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC GAAAAATAAACTGTAAATCATA TTC	140
HMBS	GCCTGCAGTTTGAAATCAGTG CGGGACGGGCTTAGCTA	110

همه واکنش های Real-Time PCR با-rotor-gene 300 real-time machine (Corbett Research, Mortlake, Australia) انجام گرفت. کنترل مثبت استفاده شده برای تمامی مراحل، نمونه DNA استخراج شده از بافت سرطان رحم آلوده به HPV-16 بود که برای اطمینان از نوع ویروس، تعیین توالی نیز شده بود. برای اطمینان از آلوده نبودن مخلوط واکنش تکثیری، نمونه ای بعنوان کنترل منفی بدون داشتن DNA الگو نیز استفاده شد.

پستان را در جمعیت‌های آسیایی (چین و ژاپن) به چاپ رساندند. آنها حضور HPV-33 DNA را در ۳۴/۱٪ از بیماران با کارسینومای مهاجم مجاری (Invasive ductal carcinoma) و در ۵٪ از ضایعات خوش‌خیم شناسایی کردند. وجود ویروس در ضایعات خوش‌خیم فرضیه اینکه در پاتوژنز سرطان پستان دخیل است را به وجود آورد ولی هیچ سروتایپ دیگری را پیدا نکردند (۱۴).

Hennig و همکارانش HPV-16 را در ۱۹ مورد از ۴۱ بیمار با کارسینومای پستان (۴۶٪) که سابقه ضایعات CIN III را داشتند، گزارش کردند (۱۵). آنها در بررسی دیگر، HPV-16 DNA را در ۳۲ مورد از ۳۸ بیمار با CIN III (۸۴٪) شناسایی کردند. همه بیماران دارای سرطان پستان مطابق با ضایعات CIN III، برای HPV-16 مثبت بودند. اما هیچ مورد مثبتی برای HPVهای ۱۱، ۱۸ یا ۳۳ پیدا نکردند (۱۲).

Damin و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با استفاده از دو مجموعه پرایمر برای ناحیه E6 ویروسهای HPV-16 و HPV-18، ۱۰۱ بلوک پارافینه را مورد بررسی قرار دادند. آنها در ۲۵ بیمار کارسینومای پستان HPV DNA (۲۴/۷۵٪) را شناسایی کردند ولی در ۲۱ مورد از بافت خوش‌خیم پستان هیچ ویروسی را مشاهده نکردند. از ۲۵ مورد مثبت، ۱۴ مورد (۵۶٪) برای HPV-16 و ۱۰ مورد برای HPV-18 (۴۰٪) مثبت بودند (۱۶).

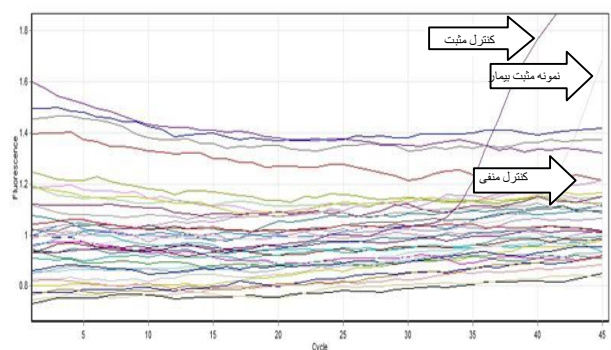
در مطالعه‌ای دیگر Kan و همکارانش ۵۰ نمونه سرطان پستان را با روش PCR برای انواع HPV ۱۶، ۱۸ و ۳۳ مورد بررسی قرار دادند و ژنوم HPV-18 را دو نمونه سرطان پستان زنان استرالیایی مشاهده نمودند. از مجموع ۵۰ نمونه، ۲۴ مورد (۴۸٪) برای HPV مثبت بودند (۱۷).

Villiers، Damine و Kan و همکارانشان در تومورهای پستان HPV را بعنوان انکوویروس داوطلب قوی برای ایجاد سرطان پستان معرفی کردند. همچنین Widschwendter و همکارانش HPV DNA را در بافت‌های سرطان پستان بیمارانی با پیشینه سرطان رحم تشخیص دادند (۹).

Yasmeen و همکارانش در سال ۲۰۰۷ (۱۸) و Akil و همکارانش در سال ۲۰۰۸ (۱۹) پیشنهاد کردند که عفونت HPV با خطر بالا می‌تواند تهاجم سلولی و متاستاز را در سرطان پستان از طریق Id-1 که یکی از اعضای خانواده فاکتورهای رونویسی مارپیچ - دور - مارپیچ می‌باشد، القاء نماید (۱۸ و ۱۹).

در تحقیقات Mendizabal-Ruiz و همکارانش از ۶۷ بیمار مکزیک با سرطان پستان و ۴۰ نمونه بافت پستان از بیماران

نمونه کنترل مثبت و منفی تکثیر شدند. در شکل ۳ منحنی تکثیر چندین نمونه سرطانی و غیر سرطانی را نشان می‌دهد که تنها یکی از موارد نمونه مثبت بیماران به همراه کنترل منفی و مثبت مشاهده می‌شود.



شکل ۳- منحنی‌های تکثیر نمونه‌های بیماران در آزمایش Real time PCR. همان طور که مشاهده می‌شود تنها کنترل مثبت و یکی از نمونه‌ها، میزان فلورسنت ساطع شده از آنها با افزایش مقادیر محصولات طی چرخه‌های واکنش PCR افزایش نشان می‌دهد.

بحث

اکثریت وسیعی از سرطان‌های پستان کارسینوماها می‌باشند که از سلول‌های پوشاننده مجاری تولید کننده شیر غدد پستانی منشأ می‌گیرند. مجموعه پیچیده‌ای از چندین مرحله، از جمله ژنتیک، محیط و فاکتورهای تغذیه‌ای در تغییر شکل بدخیم این سلول‌ها نقش دارند که همراه با هم می‌توانند مسیرهای اصلی تنظیم کننده رشد منظم سلول‌ها را تغییر داده و در نتیجه تکثیر آنها را از کنترل خارج نمایند و منجر به سرطانی‌گری گردند. درک واقعی این مسیرهای سلولی نقش مهمی در زیست‌شناسی سرطان دارد (۱).

بیشتر وقایع مولکولی دخیل در ایجاد سرطان پستان ناشناخته باقی مانده است. در مطالعات اولیه شباهت مرتبط بین سرطان پستان و ضایعات ایجاد شده نئوپلازیای درون اپی تلیالی رحمی (CIN III: cervical intraepithelial neoplasia III) گزارش شد. این مطالعات علاقه برای جستجوی HPV به عنوان یکی از عوامل در پیدایش سرطان پستان را برانگیخت (۱۲).

اولین بار در سال ۱۹۹۲، Di Ionardo و همکارانش ارتباط HPV و سرطان پستان را مطرح کردند. آنها HPV-16 DNA را در ۲۹/۴٪ از ۱۷ نمونه سرطان پستان به روش PCR مشاهده کردند (۱۳). در سال ۱۹۹۹، YU و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی ۷۲ بیمار، ارتباط بین HPV-33 و سرطان

امکان قطع واکنش نیز در زمان دلخواه مهیا شده و در صورت عدم تکثیر و یا رفتن به فاز سکون می‌توان به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود (۲۵).

یکی دیگر از برتری‌های این روش نسبت به PCR معمولی، عدم نیاز به ژل الکتروفورز برای آنالیز محصولات PCR می‌باشد که این امر احتمال آلودگی و ایجاد نتایج مثبت کاذب را کاهش می‌دهد.

با توجه به حساسیت بالای تکنیک استفاده شده در تحقیق حاضر، نتایج ما نشان داد که ژنوم این ویروس در نمونه‌های سرطانی وجود ندارد اما در سه مورد از نمونه‌های غیر سرطانی مشاهده شد. این نتیجه، فرضیه ارائه شده در خصوص نقش آن در پاتوژنز سرطان پستان را تا حدودی تقویت می‌کند. احتمالاً مشاهده نشدن ژنوم ویروس در نمونه‌های سرطانی، می‌تواند مرتبط با استفاده از مکانیسم ضربه و فرار (hit and run) برای القاء سرطان در این ویروس باشد.

طبق گزارش ارائه شده در سال ۱۹۸۷ توسط Campo، پاپیلوما ویروس‌ها از مکانیسم ضربه و فرار (hit and run) برای القاء سرطان مری استفاده می‌کنند. مطالعه آنها بر روی مدل‌های گاوی نشان داد که ویروس‌های پاپیلوما ی گاوی در مراحل اولیه سرطانزایی در پیش روده (foregut) در گاو ضروری می‌باشند، ولی برای پیشرفت تا حالت بدخیمی، حضور آنها ضرورتی ندارد (۲۶).

در مجموع فاکتورهای خطرناک متعددی در ارتباط با پیشرفت سرطان پستان، نظیر سن، سابقه خانوادگی، سابقه سرطان پستان در خود فرد و... معرفی شده‌اند، اما با این وجود ۵۰-۸۰٪ موارد فاکتورهای خطرناک هنوز شناسایی نشده‌اند. مطالعات انجام شده نیز ارتباط DNA پاپیلوما ویروس انسانی را با سرطان پستان از ۰ تا ۸۶٪ متغیر نشان می‌دهد و حتی تاکنون مکانیسم رسیدن ویروس به پستان نیز مشخص نشده است (۳).

به نظر می‌رسد عوامل متعدد دیگری از جمله فاکتورهای تغذیه‌ای و محیطی و هتروژنیسیته ژنوم جمعیت، اختلاف در روش نمونه‌گیری، نوع نمونه انتخاب شده، حساسیت تکنیک‌های آزمایشگاهی، نوع روش تشخیصی استفاده شده و آلودگی‌های احتمالی در زمان انجام واکنش حساس PCR می‌تواند از عوامل مهم در ایجاد نتایج متغیر باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن و حمایت‌های ریاست محترم آن

غیر سرطانی که با روش PCR مورد بررسی قرار گرفته بودند تنها ۳ مورد مثبت از انواع HPV ۱۶، ۱۸ و ۳۳ مشاهده شد و نوع آنها هم با تعیین توالی ژنومشان مشخص گردید (۲۰).

بر خلاف تحقیقات ذکر شده موارد دیگری از بررسی‌ها عدم حضور HPV در بافت‌های سرطانی و شاهد را نشان می‌داد.

در تحقیقی که توسط Hachana و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با روش PCR و in situ Hybridization بر روی بیماران تونسوی انجام دادند، از ۱۲۳ نمونه سرطان پستان هیچکدام از نمونه‌ها برای انواع کم‌خطر و پرخطر ویروس پاپیلوما مثبت نشدند (۲۱).

در مطالعه Lindel و همکارانش بر روی ۸۱ بیمار سوئیسی که سرطان پستان داشتند با روش PCR، هیچ نمونه مثبتی از DNA HPV یافت نشد (۲۲). در بررسی دیگر توسط Hedau و همکارانش بر روی ۲۵۲ بیمار هندی هیچ نمونه مثبتی از DNA HPV با روش PCR شناسایی نشد (۲۳). در بررسی CremouxP و همکارانش نیز از ۵۰ نمونه سرطان پستان در بیماران فرانسوی هیچ DNA HPV به روش PCR شناسایی نشد (۲۴).

در این تحقیق ما بر خلاف روش‌های به کار رفته برای مطالعه این موضوع، از روش Real Time PCR و با استفاده از رنگ فلورسانسی SYBR Green I نمونه‌ها را مورد بررسی قرار دادیم. این تکنیک که جهت تشخیص RNA و DNA استفاده می‌شود، از کارایی بالا نسبت به PCR معمولی برخوردار بوده و از برتری‌های این روش، اختصاصیت پروب DNA و حساسیت بالای آنالیز نتایج است.

این روش بر اساس بررسی میزان کمی ماده فلورسنتی عمل می‌کند و سیگنال فلورسانس به نسبت میزان محصول PCR در واکنش، افزایش می‌یابد. با ثبت میزان تابش در هر سیکل، می‌توان واکنش تکثیری را در طی فاز تصاعدی ثبت نمود و با مقدار DNA اولیه مطابقت داد. هر چه مقدار DNA بیشتر باشد شدت فلورسنت نیز بیشتر بوده و سریعتر به فاز تصاعدی می‌رسد (۲۵).

روش Real Time PCR نسبت به روش‌های دیگر نظیر Nested PCR به علت انجام کار در فضای بسته با احتمال آلودگی کمتری مواجه می‌باشد. از دیگر مزایای این روش، قابل مشاهده بودن لحظه به لحظه واکنش و نتایج آن است که امکان بررسی فرآیند تکثیر را فراهم می‌کند. بدین ترتیب امکان بهینه‌سازی واکنش، نظیر تعیین مناسب‌ترین غلظت DNA و پرایمر و همچنین تعداد سیکل تکثیری را امکان پذیر می‌سازد. از آنجایی که در این روش روند PCR قابل مشاهده می‌باشد،

واحد جناب آقای دکتر حیدری انجام گرفته است. در ضمن از معاونت محترم پژوهشی بیمارستان امام خمینی که در تهیه نمونه‌های آزمایشگاهی کمال همکاری را داشتند و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res* 2005; 7:171-79.
2. Thakur A, Xu H, Wang Y, Bollig A, Biliran H, Liao JD. The role of X-linked genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93:135-43.
3. Amarante MK, Watanabe MA. The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135:329-37.
4. Hung-Chang L, Ju-Hsin T. Data mining for DNA viruses with breast cancer, fibroadenoma, and normal mammary tissue. *Appl Math Comput* 2007; 188: 989-1000.
5. Gillison ML, Shah KV. Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:57-65.
6. E.M de Villiers EM. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papilloma virus Rep* 2001; 12:57-63.
7. E.M de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
8. Margaret E. McLaughlin-Drubin, Karl Munger. Viruses associated with human cancer. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1782 (2008) 127-150.
9. de León DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, Cetina L, Coronel A, Hes O. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer* 2009; 9:26.
10. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3221-28.
11. Evans MF, Adamson CS, Simmons-Arnold L, Cooper K. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. *BMC Clin Pathol* 2005; 5:10.
12. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53:121-35.
13. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human Papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 21:95-100.
14. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec; 19 (6B):5057-61.
15. 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 Oncol* 1999; 38:931-38.
16. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84:131-37.
17. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:9464-8.
18. Yasmeen A, Bismar TA, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, et al. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle* 2007; 6:2939-43.
19. 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. *Br J Cancer* 2008; 99:404-407.
20. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114:189-94.
21. 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; 19:541-44.

22. 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; 16:172-77.
23. 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; 11:27.
24. Cremoux P, Thioux M, Lebigot I, Sigal-Zafrani B, Salmon R, Sastre-Garau X; Institut Curie Breast Group. No evidence of human Papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109:55-58.
25. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. Available from: www.bio-rad.com. Updated: 2006.
26. Campo MS. Papillomas and cancer in cattle. *Cancer Surv* 1987; 6:39-54.