ارتباط پاپیلوما ویروس انسانی و سرطان پستان در زنان مبتلا به این سرطان در استان خوزستان

پگاه حسین‌پوری[۱]، دکتر سید حسام‌الدین حجازی[۲*]، دکتر فرانک هادی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۸/۰۷

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی در جهان است، اگرچه علت سرطان پستان به‌طور کامل شناخته نشده است، اما قرار گرفتن در معرض ویروس پاپیلوما انسانی (HPV) به‌عنوان یک عامل خطر برای سرطان پستان پیشنهاد می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی حضور HPV-DNA در نمونه‌های بافتی سرطان پستان و سالم در زنان استان خوزستان انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه گذشته‌نگر که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۴۰ بافت پارافینه سرطان از بیماران با تشخیص بدخیمی پستان و ۲۰ بافت پارافینه پستان از افراد بدون ضایعه توموری بدخیم (فیبرو آدنوما) از زنان استان خوزستان جمع‌آوری شدند. پس از استخراج DNA، تکثیر با ژن خانه‌دار بتاکتین به‌منظور بررسی کیفیت DNA استخراج شده انجام گرفت. حضور DNA ویروس HPV16,18 با روش PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون کرامر انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: DNA ویروس HPV16 در ۲۵ مورد (۶۲/۵٪) از ۴۰ نمونه توموری و DNA ویروس HPV18 در ۱۰ مورد (۲۵٪) از ۴۰ نمونه توموری مشاهده شد. هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد حضور DNA ویروس HPV16 و HPV18 را نشان نداد. از لحاظ آماری ضریب کرامر برای ویروس HPV16 و HPV18 در نمونه‌های سرطانی به‌ترتیب برابر با ۰/۵۹۸ و ۰/۳۱۶ محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: بین سرطان پستان و عفونت ویروس‌های HPV16,18 در زنان استان خوزستان ارتباط معناداری وجود دارد.

کلمات‌کلیدی: پاپیلوما ویروس انسانی، سرطان پستان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سید حسام‌الدین حجازی؛ دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. **تلفن:** ۰۶۶-۳۳۲۳۰۹۵۱؛ **پست الکترونیک:** hejazi.h@lu.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان یکی از مشکلات اصلی سلامت در سراسر جهان و یکی از دلایل اصلی مرگ‌ومیر در بین زنان است (۱، ۲). اگرچه تاکنون بسیاری از عوامل خطرزای مرتبط با سرطان پستان شناسایی شده است، اما مواردی مانند علل شروع این بیماری تاکنون ناشناخته مانده است، این موضوع منجر به انجام مطالعاتی در جهت شناسایی عوامل جدید مرتبط با این بیماری شده است (۱، ۵-۳). سرطان پستان زنان ایرانی را نسبت به سایر زنان در کشورهای توسعه‌یافته یک دهه زودتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶). چندین عامل خطر برای سرطان پستان مانند سن، سابقه خانوادگی، مصرف قرص‌های ضدبارداری و مصرف الکل و همچنین عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیک، شامل: جهش در ژن‌های BRCA1, BRCA2 & TP53، قرار گرفتن تحت تأثیر هورمون‌های جنسی استروئیدی و سبک زندگی مشخص شده است (۷، ۸). بررسی حضور عوامل ویروسی در سرطان پستان در مطالعات مختلف، بحث‌های زیادی برانگیخته است (۹). در مطالعات اخیر ارتباط بین عفونت‌های ویروسی چون ویروس اپشتین‌بار، ویروس پاپیلومای انسانی و ویروس تومور موش مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰، ۱۱). در یک مطالعه نشان داده شد که ویروس هرپس سیمپلکس به‌ویژه HSV-1 به‌عنوان کوفاکتوری در بروز سرطان پستان نقش بازی می‌کند. در برخی مطالعات ثابت شده است که این ویروس‌ها می‌توانند در شروع سرطان پستان نقش داشته باشند (۱۴-۱۲). پاپیلوما ویروس‌های انسانی دارای ژنوم دورشته‌ای کوچک، از جنس DNA و متعلق به خانواده پاپیلوماویریده[1] هستند و تاکنون بیش از ۱۰۰ ژنوتیپ مختلف از آنها شناسایی شده است (۱۵). پاپیلوما ویروس‌ها با توجه به بافتی که آلوده می‌کنند، به انواع پوستی یا جلدی، مخاطی و تناسلی گروه‌بندی می‌شوند (۱۶). اگرچه حدود ۹۰٪ از عفونت‌های ایجاد شده توسط این ویروس‌ها در بدن بدون علامت است و طی دو سال توسط سیستم ایمنی به‌طور خودبه‌خودی پاک‌سازی می‌شود، اما پایداری عفونت با این ویروس‌ها می‌تواند در حضور سایر عوامل منجر به سرطان شود. به‌عنوان مثال عفونت دهانه رحم که با انواع HPV16, 18 آغاز شده است در ۹۰٪ از موارد به سرطان دهانه رحم ختم می‌شود (۱۹-۱۷). در مورد ارتباط پاپیلوما ویروس‌ها با سرطان پستان نشان داده شده است که انواع پرخطر این خانواده ویروسی شامل HPV16,18 منجر به نامیرایی سلول‌های بافت اپی‌تلیال پستان و کاهش نیاز آنها به فاکتورهای رشد می‌شود (۲۰). در مطالعات اخیر انواع مختلف HPV در طیف گسترده‌ای از سرطان‌های نوک پستان شناسایی شده است (۷). مطالعه حاضر با بررسی ارتباط انواع پرخطر پاپیلوما ویروس‌های انسانی شامل: HPV16,18 با سرطان پستان در مبتلایان به این بیماری در استان خوزستان بر اساس روش PCR انجام شد.

روش‌کار

در این مطالعه گذشته‌نگر که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۶۰ نمونه بلوک پارافینه مربوط به افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد نرمال از بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های پاتولوژی استان خوزستان تهیه گردید. حجم نمونه با در نظر گرفتن p=۰/۷ و ضریب اطمینان ۹۵٪ و d=۰/۰۷ محاسبه گردید که با توجه به هزینه‌ها و محدود بودن نمونه‌ها، ۴۰ مورد بافت سرطان بدخیم پستان و ۲۰ مورد بافت پستان بدون ضایعه توموری بدخیم (فیبرو آدنوما) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این نمونه‌ها مربوط به سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ بودند. معیارهای ورود به مطالعه شامل: افراد نرمال، بیماران بدون سابقه ابتلاء به سرطان‌های دیگر، عدم درمان‌های مداخله‌ای، عدم مصرف سیگار یا مواد مخدر و مشروبات الکی داشتن حداقل سن ۲۳ سال و حداکثر سن ۷۰ سال بود.

به منظور استخراج DNA، ابتدا با استفاده از دستگاه میکروتوم (سایلب، انگلستان) برش‌های نازک به ضخامت ۷ میکرونی به تعداد ۱۰-۶ عدد از بلوک‌های پارافینی تهیه و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری فاقد DNase/RNase ریخته شد. بعد از دپارافینه

[1] Papillomaviridae

کردن نمونه‌ها با گزایلن (مرک، آلمان) و اتانول مطلق، DNA ژنومیک با استفاده از روش نمکی[1] استخراج گردید. استخراج از نمونه‌ها با استفاده از بافر لیزکننده (تریس، سدیم کلراید)، EDTA، سدیم دوسیل سولفات، پروتئیناز K (کیاژن، آلمان)، NaCl ۵ مولار، ایزوپروپانول سرد، اتانول ۷۰٪ و بافر TE با کمک چند مرحله سانتریفیوژ در rpm ۱۴۰۰۰ و استفاده از حمام آب گرم صورت گرفت (۲۱).

غلظت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (بایوتک، آمریکا) تعیین شد. نسبت جذب نوری (OD)[2] طول موج‌های ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه‌هایی که این نسبت را از ۱/۸ تا ۲ نشان دادند، برای انجام PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن بتااکتین انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور تکثیر ژن بتااکتین

تکثیر ژن بتااکتین در DNA نمونه‌های توموری با روش PCR و استفاده از آغازگرهای طراحی شده جدول ۱ صورت گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در ویال‌های ۰/۲ میلی‌لیتری شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت و با چرخه دمایی شامل: واسرشت‌سازی ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای مشاهده باند ۱۶۱ جفت بازی الکتروفورز شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌منظور بررسی حضور ژن ویروس HPV16, 18

پس از کالیبره کردن آزمایشات با ژنوم ویروس‌های HPV16,18 و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای این ویروس‌ها که در جدول ۱ نشان داده شده است، تمام نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن بتااکتین، برای شناسایی و تشخیص DNA ویروس HPV16,18 مجدداً PCR شدند (۲۲). واکنش PCR در ویال‌های ۰/۲ میلی‌لیتری در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری و با چرخه دمایی شامل: واسرشت‌سازی ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴/۸ برای HPV16 و ۵۵ برای HPV18 به‌مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵٪ برای مشاهده باند ۱۲۰ جفت بازی برای HPV16 و ۴۱۲ جفت بازی برای HPV18 الکتروفورز شدند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی به‌کاررفته در این پژوهش

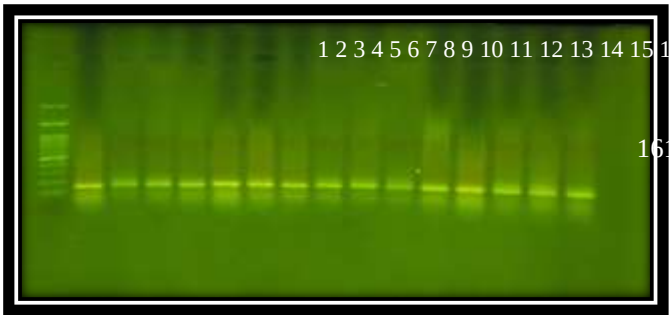
اختصاصیت	توالی آغازگر (′۳→′۵)	اندازه محصول (bp)
بتااکتین	F: AGACGCAGGATGGCATGGG R: GAGACCTTCAACACCCCAGCC	۱۶۱
HPV16	F: TCA AAA GCC ACT GTG TCC TG R: CGT GTT CTT GAT GAT CTG CA	۱۲۰
HPV18	F: ATAGCAATTTTGATTTGTC R: AAACTCATTCCAAAATATG	۴۱۵

[1] Salting out
[2] Optical Density

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و شدت همبستگی توسط آزمون فی کرامر و نسبت شانس (OR) با سطح اطمینان ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

استخراج DNA و بررسی کیفیت آن: جذب نوری تمامی DNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ بین ۲-۱/۸ بود. همچنین همه نمونه‌ها ژن بتااکتین را با PCR تکثیر نمودند و بر روی ژل آگارز باند ۱۶۱ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی الکتروفورز محصول PCR ژن بتااکتین در نمونه‌های توموری و شاهد. چاهک ۱: نشان‌گر وزن مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های ۱۱-۲: نمونه‌های توموری، چاهک‌های ۱۶-۱۲: نمونه‌های سالم، چاهک ۱۷: کنترل منفی (آب).

انجام واکنش PCR برای بررسی حضور ویروس HPV16,18 در نمونه‌های توموری و سالم بافت پستان: DNA ژنومی مربوط به نمونه‌های سرطانی و شاهد با کمک آغازگرهای اختصاصی ویروس HPV16,18 تکثیر گردید و محصولات PCR با روش ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲، ۳).

شکل ۲- الگوی الکتروفورز محصول PCR بافت توموری با آغازگر اختصاصی ویروس HPV16، چاهک اول: نشانگر وزن مولکولی، چاهک‌های ۲-۱۰: نمونه‌های توموری که دارای ژنوم ویروس HPV16 بودند، چاهک ۱۱: کنترل منفی (آب)، چاهک ۱۲: کنترل مثبت، چاهک‌های ۱۳-۱۷: نمونه‌های سالم

شکل ۳- الگوی الکتروفورز محصول PCR بافت توموری با آغازگر اختصاصی ویروس HPV18، چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی، چاهک‌های ۱۰-۲: نمونه‌های توموری که دارای ژنوم ویروس HPV18 بودند، چاهک ۱۱: کنترل مثبت چاهک ۱۲: کنترل منفی (آب)، چاهک‌های ۱۷-۱۳: نمونه‌های سالم

نتایج این مطالعه نشان داد که از ۴۰ نمونه توموری، ۲۵ مورد (۶۲/۵٪) برای HPV16، ۱۰ مورد (۲۵٪) برای HPV18 و ۴ نمونه (۱۰٪) برای HPV16 و HPV18 مثبت بودند؛ از نمونه‌های شاهد هیچ مورد مثبتی گزارش نشد (جدول ۲).

جدول ۲- میزان حضور DNA ویروس‌های HPV16, 18 در نمونه‌های سرطانی و غیرسرطانی

نوع ویروس HPV	نمونه نرمال (۲۰ مورد)	نمونه سرطانی (۴۰ مورد)	سطح معنی‌داری
HPV16	-	۲۵ (۶۲/۵)	۰
HPV18	-	۱۰ (۲۵)	۰/۰۱۴

مقدار ضریب همبستگی کرامر برای ویروس HPV16 برابر با ۰/۵۹۸ و همچنین برای ویروس HPV18 در نمونه‌های سرطانی برابر با ۰/۳۱۶ بود. از آن‌جایی که مقدار معیار تصمیم کوچک‌تر از ۰/۰۵ است، لذا فرضیه صفر (عدم ارتباط معنادار بین ویروس و سرطان) رد می‌شود، یعنی بین آلودگی با ویروس HPV16 و HPV18 و سرطان پستان ارتباط معناداری وجود داشت؛ همچنین آماره نسبت شانس با فاصله اطمینان ۹۵٪ برای ویروس HPV16 برابر (۲۷۸/۸۱۸ و ۴/۱۷۷) ۳۴/۱۲۵ و برای ویروس HPV18 برابر (۶۲/۱۲۶ و ۰/۸۹۴) ۷/۴۵۲ محاسبه شد؛ لذا از آنجایی که این نسبت ۱ نشده است، استقلال وجود ندارد و می‌توان گفت آلودگی ویروس پاپیلوما سبب افزایش ابتلاء به سرطان پستان در استان خوزستان می‌شود.

بحث

سرطان پستان یک بیماری با پتانسیل کشندگی بالا است که به‌عنوان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان‌ها به‌شمار می‌رود و تقریباً از هر ۸ زن، یک نفر در کشورهای توسعه‌یافته به نحوی با این بیماری درگیر است و از نظر شدت بیماری دارای مراحل ابتدایی تا پیشرفته بوده و در بیشتر موارد منجر به جراحی کامل بافت پستان، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و هورمون‌درمانی می‌گردد (۲۳). مطالعات جهانی افزایش شیوع این بیماری را در کشورهای مختلف هشدار می‌دهند (۲۴). دانشمندانی که به مطالعه این بیماری می‌پردازند، به ریسک فاکتورهای متعددی در این زمینه اشاره می‌کنند که برای کمتر از نیمی از تمام موارد سرطان پستان توجیه کننده است، اما مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با ایجاد سرطان پستان هنوز در مراحل اولیه شناسایی قرار دارند (۲۵). یکی از ریسک فاکتورهای مهم در این زمینه، دخالت ویروس‌های مختلف در ایجاد سرطان پستان می‌باشد و محققان زیادی به‌طور گسترده آن را مورد مطالعه قرار داده‌اند و نتایج بسیار متغیری گزارش نموده‌اند. برخی شواهد موافق یا مخالف با این موضوع بوده، از این رو ارتباط ویروس‌ها و سرطان پستان همواره یک مسئله بحث‌برانگیز بوده است (۲۶).

برای اولین بار جان بیتنر و همکاران (۱۹۴۱) این احتمال را مطرح کردند که ویروس‌ها ممکن است در ایجاد سرطان پستان نقش داشته باشند. آنها در شیر موش یک فاکتور ناشناخته را گزارش نمودند که نوزادان در حال رشد را به تومور پستان مبتلا می‌کرد، این فاکتور ناشناخته بعدها به عنوان ویروس تومور پستان موش (MMTV)[1] معرفی گردید (۲۷).

اولین بار دی لوناردو و همکاران (۱۹۹۲) ارتباط HPV و سرطان پستان را مطرح نمودند. بدین‌صورت که DNA مربوط به HPV16 را در ۲۹/۴٪ از ۱۷ نمونه سرطان پستان به روش PCR مشاهده کردند و چندین سال بعد لابرک و همکاران (۱۹۹۵) حضور ویروس EBV را در سرطان پستان گزارش نمودند (۲۸، ۲۹). در خصوص مکانیسم اولیه این ارتباط گزارش شده است ویروس‌هایی نظیر EBV، HBV و HPV می‌توانند باعث بی‌ثباتی ژنوم، تکثیر خارج از کنترل سلول‌ها، بیان آنکوژن‌ها، مهار مرگ برنامه‌ریزی شده[2] و نامیرایی[3] سلول‌های سرطانی شوند (۳۰). لذا، در نهایت ویروس‌های سرطان‌زا به‌عنوان عامل احتمالی ۲۰-۱۸٪

[1] Mouse Mammary Tumor Virus
[2] Apoptosis
[3] Immortalization

از انواع سرطان‌ها معرفی شده‌اند (۳۱). در مطالعه حاضر به بررسی ویروس پاپیلوما در بیماران مبتلا به سرطان پستان پرداخته شد. این ویروس پرخطر با تولید پروتئین‌های آنکوژنی E6 و E7 سبب اختلال در چرخه سلولی و تغییر شکل بدخیمی سلول‌های آلوده به ویروس می‌شوند؛ E6 موجب آغاز تجزیه P53 و E7 با اتصال به رتینوبلاستوما (RB)، موجب تخریب ترکیب Rb/E2F می‌گردد (۳۲). بیشترین فراوانی پاپیلوما ویروس در نمونه‌های سرطان پستان مربوط به سروتایپ ۱۶ و بعد از آن ۱۸ هست، اما با این‌حال حضور انواع ۶، ۱۱ و ۳۳ نیز تشخیص داده شده‌اند (۳۳). در مطالعه حاضر فراوانی ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ در استان خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. حضور DNA ویروس HPV16 در ۲۵ مورد از ۴۰ نمونه توموری (۶۲/۵٪) و ژنوم HPV18 در ۱۰ مورد از ۴۰ (۲۵٪) نمونه توموری تأیید شد که این مطالعه در راستای تحقیقات سیدی علوی و همکاران (۲۰۰۹) بود. آنها ۵۰ مورد بافت سرطانی پستان را مورد بررسی قرار دادند که ۲۴ مورد (۴۸٪) از نمونه‌های کارسینوم پستان حاوی DNA ویروس پاپیلومای انسانی بوده و از این تعداد ۱۳ مورد (۲۶٪) مربوط به عفونت پاپیلومای انسانی با خطر بدخیمی بالا گزارش شده بود (۳۴). در مطالعه آنتونسون و همکاران (۲۰۱۱) که بر روی ۵۴ بیمار مبتلا به سرطان پستان انجام شد، حضور DNA-HPV18 در ۵۰٪ از نمونه‌ها تأیید گردید (۳۳). در مطالعه سیگارودی و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی ۷۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان در شمال ایران انجام شد، ۲۶/۶۷٪ از مجموع نمونه‌های مثبت مربوط به HPV16 و HPV18 بودند (۳۵). در مطالعه عزیزسلمان و همکاران (۲۰۱۷) از ۱۱۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان، ۴۲٪ از نظر DNA-HPV مثبت گزارش شد که از این تعداد ۱۲٪ مربوط به DNA-HPV18 بود (۳۶). تحقیقی که توسط دلگادو و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ۲۵۱ بیمار مبتلا به سرطان پستان در اسپانیا انجام گرفت که ۵۱/۸٪ از نمونه‌های توموری و ۲۶/۳٪ از نمونه‌های سالم از لحاظ حضور DNA-HPV به‌خصوص HPV16 مثبت ارزیابی شدند (۳۷). در مطالعه کاوالکانت و همکاران (۲۰۱۸) که بر روی زنان برزیلی صورت گرفت، DNA-HPV در ۴۹/۵٪ نمونه سرطانی و ۱۵/۲٪ از نمونه‌های سالم مشاهده شد (۳۸). اما علاوه بر موارد ذکر شده در برخی پژوهش‌ها برخلاف نتایج تحقیقاتی که در استان خوزستان به‌دست آمد، عدم حضور DNA ویروس HPV در بافت‌های سرطانی نیز گزارش شده است. در مطالعه هاچانا و همکاران (۲۰۱۰) که با روش PCR بر روی بیماران تونسی انجام شد، از ۱۲۳ نمونه سرطان پستان، هیچ‌کدام از نمونه‌ها برای انواع کم‌خطر و پرخطر ویروس پاپیلوما مثبت نشدند (۳۹). در مطالعه کرموکس و همکاران (۲۰۰۸) نیز از ۵۰ نمونه سرطانی از بافت پستان در بیماران فرانسوی، هیچ ژنومی مربوط به ویروس HPV با روش PCR یافت نشد (۴۰). همچنین در مطالعه آهنگر اسکویی و همکاران (۲۰۱۴) از مجموع ۶۵ بیمار ایرانی، ۲۲ نفر را برای حضور ژنوم ویروس HPV مثبت اعلام نمودند. آنها شیوع DNA-HPV6 را از بقیه بیشتر گزارش نمودند، اما تعداد بسیار کمی از نمونه‌ها نیز برای حضور HPV11, 16, 35, 52 نیز مثبت بودند، با این‌حال نتایج مطالعه آنها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن ارتباط انواع پرخطر پاپیلوماویروس با سرطان پستان نبود (۴۱). در بررسی کلی در یک مقاله مروری عنوان شد در بین ۳۷ مقاله مختلف که با روش‌های مولکولی مانند PCR، دورگه‌سازی و ایمنوهیستوشیمی یا الایزا ارتباط ویروس HPV با سرطان پستان را ارزیابی نموده‌اند؛ در حدود ۶ مورد این ارتباط را تأیید و ۵ مورد رد کرده‌اند و در ۲۶ مورد نتایج قطعی حاصل نگردیده است و حضور این ویروس را در نمونه‌های مختلف بین ۸۶-۰٪ گزارش نموده‌اند (۳۲، ۴۲). با این‌حال آلودگی با ویروس HPV به‌عنوان عامل خطر برای سرطان پستان، در مطالعات مختلف همچنان مبهم و مورد بحث است (۴۳). اگرچه بسیاری از محققان علت این تناقض را در اختلافات ناشی از شکست در شناسایی ویروس مورد نظر و یا تفاوت در روش‌های مورد استفاده در تشخیص و یا تفاوت در تجزیه و تحلیل می‌دانند (۴۴). اما این‌گونه به‌نظر می‌رسد که با توجه به ویروس‌های

مختلفی که به‌عنوان عامل ایجاد کننده سرطان پستان در نظر گرفته می‌شوند، در هر کدام از مطالعات فقط به بررسی حضور یک ویروس پرداخته شده و ویروس‌های دیگر را مورد مطالعه قرار نداده‌اند؛ بنابراین طبیعی است که همچنان نتایج متناقضی گزارش گردد. به‌همین منظور در این تحقیق از نمونه‌های DNA استخراج شده استان خوزستان استفاده گردید که در سال ۲۰۱۸ به بررسی ویروس EBV در این نمونه‌ها پرداخته و ارتباط بین آن را بی‌معنی گزارش کرده بود. همزمان با آن در نمونه‌های مربوط به استان اصفهان رابطه معنی‌دار گزارش گردید (۲۱، ۴۵)، اما در این مطالعه زمانی که به بررسی ویروس HPV در همان نمونه‌های مربوط به استان خوزستان پرداخته شد، ارتباط معنی‌دار شد که یک نتیجه قابل بحث بود. این تحقیق مشخص می‌نماید که برای بررسی ارتباط بین ویروس و سرطان پستان باید مجموعه‌ای از ویروس‌های دخیل در این بیماری به‌طور همزمان مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گیرد و مطالعه یک ویروس خاص در مناطق مختلف ممکن است نتایج متناقضی را ایجاد نماید؛ بنابراین این‌گونه به‌نظر می‌رسد که برای سرطان پستان حداقل حضور یک ویروس می‌تواند یکی از علل ایجاد این سرطان باشد که طبعاً مطالعات بیشتری برای اثبات آن باید صورت بگیرد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه، عدم دسترسی به بیماران جهت تهیه پرسش‌نامه و بررسی سایر عوامل دخیل در این بیماری بود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌دار بین حضور ویروس HPV16, 18 و سرطان پستان را در استان خوزستان نشان داد؛ ولی با توجه به تناقض نتایج تحقیقات در مورد ارتباط DNA پاپیلوما ویروس انسانی با سرطان پستان در دنیا و در ایران می‌توان با کمک روش‌های مولکولی در کنار سایر روش‌ها و با انتخاب جامعه آماری در استان‌های مختلف ایران یا نژادهای مختلف به‌طور جداگانه این ارتباط را بررسی و جمعیت‌های پرخطر را شناسایی نمود؛ سپس با توجه به تولید روزافزون واکسن ضدویروس HPV می‌توان جمعیت‌های پرخطر را علیه این ویروس واکسینه نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد با کد تصویب ۱۰۰۱۶ در دانشگاه لرستان تصویب و انجام گردیده است. بدین‌وسیله از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های استان خوزستان و بیمارانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، همچنین از خانم دکتر زهرا امینی فارسانی عضو هیأت علمی گروه آمار دانشگاه لرستان که در انجام آزمون‌های آماری این تحقیق به ما کمک نمودند و همچنین از دانشگاه لرستان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. de León DC, Montiel DP, Nemcova J, Mykyskova I, Turcios E, Villavicencio V, et al. Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. BMC Cancer 2009; 9:26.
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. Haghshenas MR, Mousavi T, Moosazadeh M, Afshari M. Human papillomavirus and breast cancer in Iran: a meta-analysis. Iran J Basic Med Sci 2016; 19(3):231.
4. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? J Cell Mol Med 2005; 9(1):208-21.
5. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. Clin Breast Cancer 2005; 6(5):391-401.
6. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(1):24-7.

7. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. Breast Cancer Research 2004; 7(1):R1.
8. Hulka BS, Moorman PG. Reprint of Breast cancer: hormones and other risk factors. Maturitas 2008; 61(1-2):203-13.
9. Lawson JS, Günzburg WH, Whitaker NJ. Viruses and human breast cancer; 2006.
10. 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.
11. Lawson JS, Heng B. Viruses and breast cancer. Cancers 2010; 2(2):752-72.
12. Kaveh F, Amini K, Sadeh M. Prevalence of Herpes Simplex Virus type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) in the women with breast cancer by Multiplex-PCR method. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2018; 21(3):39-44. (Persian)
13. Lawson JS, Salmons B, Glenn WK. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). Front Oncol 2018; 8:1.
14. Khodabandehlou N, Mostafaei S, Etemadi A, Ghasemi A, Payandeh M, Hadifar S, et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. BMC Cancer 2019; 19(1):61.
15. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324(1):17-27.
16. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189(1):12-9.
17. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. J Am Med Assoc 2002; 287(16):2114-9.
18. Acevedo-Nuño E, González-Ojeda A, Vázquez-Camacho G, Balderas-Peña Luz Ma A, Moreno-Villa H, Montoya-Fuentes H. Human papillomavirus DNA and protein in tissue samples of oesophageal cancer, Barrett's oesophagus and oesophagitis. Anticancer Res 2004; 24(2C):1319-23.
19. Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiei A, Emadeian O, Shykhpour A, Ashrafi GH. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. Infect Agent Cancer 2013; 8(1):20.
20. Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(1):463-7.
21. Saeedi Z, Hadi F, Hejazi SH, Salahshournia Z. The relationship between EBV virus and breast cancer in Khuzestan province of Iran. Appl Biotechnol Rep 2018; 5(1):37-41.
22. Moradi A, Mobasheri E, Tabarraei A, Bakhshandeh Nosrat S, Azarhosh R, Alizadeh SH, et al. Molecular epidemiology of Human Papillomaviruses in breast cancer, Golestan province of Iran. Med Lab Journal 2009; 3(1): 9-14. (Persion)
23. Heravi Karimovi M, Pourdehqan M, Jadid Milani M, Foroutan SK, Aieen F. Study of the effects of group counseling on quality of sexual life of patients with breast cancer under chemotherapy at Imam Khomeini Hospital. J Mazandaran Univ Med Sci 2006; 16(54):43-51. (persion)
24. Wilson CM, Tobin S, Young RC. The exploding worldwide cancer burden: the impact of cancer on women. Int J Gynecol Cancer 2004; 14(1):1-11.
25. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst 1995; 87(22):1681-5.
26. Joshi D, Buehring GC. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. Breast Cancer Res Treat 2012; 135(1):1-15.
27. Bittner JJ. The preservation by freezing and drying in vacuo of the milk-influence for the development of breast cancer in mice. Science 1941; 93(2422):527-8.
28. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. Breast cancer research and treatment 1992; 21(2):95-100.
29. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. Cancer res 1995; 55(1):39-45.
30. Masrour-Roudsari J, Ebrahimpour S. Causal role of infectious agents in cancer: An overview. Caspian J Intern Med 2017; 8(3):153.
31. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta 1996; 1288(2):F55-78.
32. Gannon OM, Antonsson A, Bennett IC, Saunders NA. Viral infections and breast cancer–A current perspective. Cancer Letters 2018; 420:182-9.
33. Antonsson A, Spurr TP, Chen AC, Francis GD, McMillan NA, Saunders NA, et al. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. Journal of medical virology 2011; 83(12):2157-63.
34. Seyedi Alavi G, Sharifi N, Sadeghian A, Jabari H, Bahreyni M, Bagheri H. Presence of human papilloma virus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological features. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2009; 12(2):1-4. (persion)

35. 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. Sci World J. 2012; 2012:837191.
36. Salman NA, Davies G, Majidy F, Shakir F, Akinrinade H, Perumal D, et al. Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based Study. Sci Rep 2017; 7:43591.
37. 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):320.
38. Cavalcante JR, Pinheiro LGP, Almeida PRC, Ferreira MVP, Cruz GA, Campelo TA, et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. Clinics (Sao Paulo) 2018; 73:e465.
39. Hachana M, Ziadi S, Amara K, Toumi I, Korbi S, Trimeche M. No evidence of human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. The Breast 2010; 19(6):541-4.
40. de 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(1):55-8.
41. 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 Pac J Cancer Prev 2014; 15(9):4061-5.
42. Morris BJ, Gray RH, Castellsague X, Bosch FX, Halperin DT, Waskett JH, et al. The strong protective effect of circumcision against cancer of the penis. Adv urol 2011; 2011.
43. Heng B, Glenn WK, Ye Y, Tran B, Delprado W, Lutze-Mann L, et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. Brit J Cancer 2009; 101(8):1345-50.
44. Murray PG. Epstein–Barr virus in breast cancer: artefact or aetiological agent? J Pathol 2006; 209(4):427-9.
45. Salahshor Z, Hejazi H, Hadi F, Saeedi Z. The Study of Relationship Between Epstein-Barr virus and Breast Cancer in Isfahan Province. Iran J Breast Dis 2018; 11(2):16-24. (Persion).