

Evaluation of Human Papilloma Virus (HPV) Genotype Diversity in Oral Cancer Lesions of Patients in Imam Khomeini Hospital

Elham Pouide¹, Ehsan Arefian^{2*}, Ali Asghar Deldar³, Abbas Akhavan Sepahy⁴

1- M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Science, Olum Tahghyghat University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Molecular Virology Lab, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Science, Maleke Ashtar University, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Microbiology, College of Biology, Azad University, North of Tehran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1417614411, Molecular virology lab, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Iran
Email: arefian@ut.ac.ir*

Received: 08/Jun/2016, Accepted: 16/Nov/2016

Abstract

Objective: Squamous cell carcinoma comprises approximately 94% of all oral cancers. One reason for this cancer is human papilloma virus (HPV) and its different genotypes. Determining the most common genotypes can assist with control and prevention of squamous cell carcinoma.

Methods: We obtained 70 paraffin blocks from the Oncology Department at Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. All samples included the histopathological report of dysplastic lesions. Samples were deparaffinated. Four primers were designed for PCR of samples. Positive samples were sequenced.

Results: We have observed that 8 samples were HPV positive, from which there were 3 HPV6 and 5 HPV16. HPV6 is one source for genital warts that can be spread by skin contact or oral-sexual behavior. There were 3 positive samples found in women, whereas the remainder were from men (2% more in men). People between the ages of 30 to 45 have increased sensitivity for HPV compared to the other group. People up to 60 years of age are also sensitive. All samples have been collected from different cities in Iran, however most of the positive samples were found in Tehran and Islam Shahr.

Conclusion: These data confirmed that HPV infection with high risk types (6, 16) could be one of the risk factors for oral cancer which could be spread by genital warts.

Keywords: Human papilloma virus, HPV6, HPV16, Squamous cell carcinoma, Polymerase chain reaction

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 19-27

بررسی تنوع ژنوتیپی ویروس پاپیلومای انسانی در نمونه‌های ضایعات دهانی بیماران مبتلا به سرطان دهان در نمونه‌های آرشیو بیمارستان امام خمینی

الهام پوییده^۱، احسان عارفیان^{۲*}، علی اصغر دلداری^۳، عباس اخوان سپهری^۴

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- استادیار، آزمایشگاه ویروس شناسی مولکولی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۶۱۴۴۱۸، دانشگاه تهران، پردیس علوم پایه، دانشکده زیست شناسی، بخش ویروس شناسی
Email: arefian@ut.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۸/۲۶

دریافت مقاله: ۹۵/۰۳/۱۹

چکیده

هدف: سرطان سلول سنگفرشی حدود ۹۳ درصد از سرطان‌های حفره دهانی را تشکیل می‌دهد. یکی از عوامل ایجاد کننده این سرطان، ویروس پاپیلومای انسانی است که تنوع ژنوتیپی گوناگونی دارد. تعیین ژنوتیپ‌های شایع پاپیلوما در ایجاد سرطان دهان می‌تواند در کنترل و جلوگیری از انتقال آن نقش داشته باشد.

مواد و روش‌ها: ۷۰ نمونه بافت پارافینه از بخش سرطان بیمارستان امام خمینی تهران تهیه و پارافین زدایی شد، برای شناسایی ژنوتیپ‌های ۶-۱۶-۱۸-۳۳-۳۴ با کمک نرم افزار 7 AlleleID، ۱ آغازگر سنس و ۳ آغازگر آنتی سنس منحنط (دژره) طراحی شد. نمونه‌ها PCR شد و سپس محصول واکنش روی ژل آگارز، الکتروفورز شد. توالی نمونه‌های مثبت ویروس پاپیلومای انسانی تعیین و نتایج توالی‌یابی توسط Blast تعیین هویت شد.

نتایج: ۸ نمونه ویروس پاپیلومای انسانی مثبت به دست آمد که ۳ نمونه ویروس پاپیلومای انسانی تایپ ۶ و ۵ نمونه ویروس پاپیلومای انسانی تایپ ۱۶ بودند. ویروس پاپیلومای انسانی تایپ ۶ عامل مولد زگیل تناسلی است که از طریق تماس پوست با پوست یا روابط دهانی تناسلی انتشار می‌یابد. از بین نمونه‌ها، ۳ نمونه مربوط به زنان و ۵ نمونه مربوط به مردان است. بالاترین نمونه‌های مثبت ویروس پاپیلومای انسانی مربوط به شهر تهران و پس از آن اسلامشهر است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که عفونت تایپ‌های با خطر بالای ویروس پاپیلومای انسانی (تایپ ۶ و ۱۶) می‌تواند یکی از عوامل خطرزا برای سرطان دهان باشد که از طریق زگیل‌های تناسلی انتشار می‌یابد.

کلیدواژگان: سرطان سلول سنگفرشی، ویروس پاپیلومای انسانی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۲۷-۱۹

مقدمه

پیش سرطانی مشاهده می‌شود. این بیماری اغلب، لثه، غدد بزاقی، لب، غدد لنفاوی گردن، لوزه‌ها، گونه‌ها، فک و زبان را درگیر کرده و سبب لق شدن دندان‌ها، بدشکلی صورت،

سرطان دهان از کنترل خارج شدن رشد و تکثیر سلول‌های سنگفرشی دهان است که سرطان سنگفرشی (Squamous Carcinoma) نامیده می‌شود و در ابتدا به صورت ضایعات

به موقع و پیشگیری کننده از سرطان دهان برداشته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی ۷۰ نمونه قالب پارافینی که دارای بافت کافی بود از بین پرونده‌های موجود در بخش سرطان در بیمارستان امام خمینی تهران پس از اخذ تأییدیه از کمیته اخلاق پزشکی انتخاب شد. این نمونه‌ها از سراسر کشور جمع‌آوری و به این مرکز انتقال یافته بود که ۳۵ نمونه مربوط به زنان و ۳۵ نمونه مربوط به مردان بود. سن بیماران مراجعه کننده نیز از ۱۵ تا ۷۵ سال بود. اسلایدهای میکروسکوپی بررسی شد و وجود سرطان در بافت‌ها تأیید شد.

استخراج DNA و PCR

نمونه‌ها به وسیله دستگاه میکروتوم به قطر ۰/۹ میلی‌متر برش زده شد و به مدت یک شب در دمای محیط قرار گرفت. سپس بافت‌ها پارافین‌زدایی شد. برای این کار از بافر پارافین‌زدایی (Deparaffinization)، اتانل، بافر لیزکننده و پروتئاز در مراحل مختلفی استفاده شد و سانتریفوژ انجام گرفت. در مرحله پایانی نمونه‌ها توسط بافر شستشو (Elution Buffer) از ستون جدا شد و محلول محتوی DNA سریعاً به فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

برای تعیین مقدار و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز، استفاده شد. باندهای حاصل از DNA در هر نمونه که دارای کمترین کشیدگی و کاملاً واضح بود، کیفیت مطلوب DNA را نشان داد. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) روی نمونه‌ها، ابتدا ۵ آغازگر سنس و ۱۳ آغازگر آنتی‌سنس بر اساس پروتئین L کپسید ویروس طراحی شد. پس از منحنی شدن (دژنره) در نهایت یک آغازگر سنس و سه آغازگر آنتی‌سنس به دست آمد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

گلودردهای مداوم، اختلال در بلع، زخم‌های سفید و دیر خوب شونده در دهان و گوش دردهای طولانی مدت می‌شود [۳-۱].

عوامل متعددی از قبیل مصرف سیگار و الکل، روابط جنسی دهانی-تناسلی، سابقه سرطان، دندان خراب، نور خورشید، رژیم غذایی فاقد میوه و سبزی تازه و سن بالای ۴۰ سال، شانس ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد [۴-۶].

پاپیلوما ویروس (Papillomavirus) از خانواده ویروس‌های DNA دار دو رشته‌ای، دارای ۱۰۰ ژنوتیپ مختلف است که تمایل بسیاری به سلول‌های پوششی پوست و سلول‌های مخاطی دارد. بنابراین در پوست طبیعی افراد سالم به وفور یافت می‌شود و حتی می‌تواند سبب بروز انواع سرطان‌ها از جمله سرطان دهان شود [۷-۱۱].

اگر ضایعات پیش سرطانی در مراحل اولیه عفونت تشخیص داده نشود، از ضایعه خوش‌خیم به بدخیم تبدیل می‌شود [۱، ۱۲]. بنابراین تشخیص به موقع عفونت ویروسی می‌تواند در جلوگیری از پیشرفت ضایعات مؤثر باشد. اگرچه ویروس پاپیلوما ژنوتیپ‌های مختلفی دارد، اما تمام ژنوتیپ‌های آن نمی‌تواند سبب بروز سرطان دهان شود.

اربابی و همکاران با بررسی نمونه‌های بزاق دهان و استفاده از روش RT-PCR، فقط ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ را در ارتباط با سرطان دهان شناسایی کردند [۱۳]. در روش PCR نیز نتیجه مشابه به دست آمده و ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ استخراج شدند [۱۴-۲۶]. در اسپانیا تنها ژنوتیپ ۱۶ را از نمونه بیماران جدا کردند [۱۵-۱۷]. در هند نیز ژنوتیپ ۱۸ از نمونه بیماران به دست آمد [۱۲، ۱۸، ۱۹].

در آرژانتین نیز ژنوتیپ‌های ۶ و ۱۶ از نمونه‌های بیماران جداسازی گردید [۹، ۲۰-۲۲].

با توجه به اهمیت پاپیلوما ویروس در ایجاد سرطان دهان، این تحقیق بر پایه شناسایی ژنوتیپ‌های شایع این ویروس در ایجاد بیماری در بین مراجعه‌کنندگان به بیمارستان امام خمینی تهران انجام گرفته است تا شاید گامی در راستای شناسایی

جدول ۱ آغازگرهای لازم برای تکثیر و شناسایی نمونه‌های HPV پر خطر

توالی	وضعیت
GCN CAG GGH YWH AAY AAT GG	آغازگر سنس
GCC MAR SGG AAA CTG ATC	آغازگر آنتی سنس
GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT	آغازگر آنتی سنس RS
CGW CCH ARD GGR WAY TGR TC	آغازگر آنتی سنس RFG

جدول ۲ مواد تشکیل دهنده واکنش PCR و میزان آن‌ها

ترکیبات	مقادیر (میلی لیتر)
آغازگر سنس	۱
آغازگر آنتی سنس	۱
مخلوط اصلی (Master mix)	۱۲/۵
DNA الگو	۱۰۰ نانوگرم
H ₂ O استریل	تا حجم نهایی ۲۵

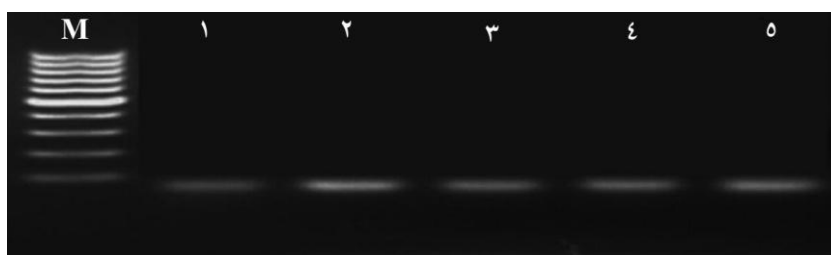
سپس مخلوط PCR در حجم ۲۵ میلی لیتر به شرح زیر

تهیه شد و درون تیوب‌های ۰/۲ میلی لیتری استریل آماده شد (جدول ۲).

- سپس فرآیند PCR شامل مراحل زیر انجام گرفت:
- مرحله اول شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه
- مرحله دوم شامل ۴۰ چرخه سه مرحله‌ای مشتمل بر:
- ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه
- ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه
- ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه
- مرحله سوم شامل ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه
- بعد از پایان فعالیت دستگاه، فرآورده‌های PCR به دستگاه الکتروفورز انتقال یافت و سرانجام نتایج پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) با استفاده از نورافشان اشعه فرابنفش بررسی شد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱ تصویر نمونه‌های HPV تیپ ۱۶؛ نمونه‌های ۲، ۳ و ۴ دارای باند مثبت روی ژل در ناحیه ۴۳۵ جفت باز هستند محصول PCR مرتبط به نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی در شکل مشخص شده است.



شکل ۲ تصویر نمونه‌های HPV تیپ ۱۶؛ نمونه ۱ به عنوان کنترل مثبت و نمونه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ دارای باند ۴۹۲ جفت باز روی ژل هستند.

توالی یابی و تحلیل نتایج

ژنوتایپ ویروس، برای HPV-6 دارای طولی معادل ۴۳۵ و برای HPV-16 طولی معادل ۴۹۲ جفت باز داشت. مثبت شدن این نمونه‌ها نشان می‌داد بروز سرطان سر و گردن می‌تواند با

نتایج نشان داد که از ۷۰ نمونه تحت بررسی، تنها ۸ نمونه مثبت شد. محصول PCR در نمونه‌های مثبت بر حسب نوع

بررسی تنوع ژنوتیپی ویروس پاپیلوما ی انسانی

ارتباط با سرطان دهان بررسی شد. سپس ارزیابی حضور ویروس پاپیلوما ی انسانی توسط روش PCR انجام شد تا حضور ویروس در DNA بیماران به صورت مثبت یا منفی تعیین شود. مزیت مهم روش PCR نسبت به سایر روش ها و دلیل انتخاب آن در این مطالعه، اختصاصی بودن و حساسیت بالای این روش است که با استفاده از DNA به راحتی قابل انجام است [۱۱، ۲۵، ۲۶].

در سال ۱۳۸۳ گلزاری و همکارانش در دانشگاه زاهدان ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما و سرطان سر و گردن را بررسی کردند. آن ها قالب های پارافینی بافت سرطانی ۵۰ بیمار را تهیه و برای تشخیص ژنوتیپ های ۱۶-۱۸-۳۳-۳۱-۶ و ۱۱ آن ها را بررسی کردند. از بین این نمونه ها ۷ نمونه HPV مثبت شد که ۴ نمونه ژنو تیپ ۱۶ و سه نمونه ژنوتیپ ۳۱ بودند. این آمار شباهت زیادی به آمار موجود در کشورهایی مانند آمریکا و ژاپن و کشورهای اروپایی داشت. در حالی که به دلیل شباهت نزدیکی بین مردم ایران و شبه قاره هندوستان انتظار می رفت شباهت بیشتری بین آمارهای ایران با هندوستان وجود داشته باشد [۱]. این در حالی است که در تحقیق اخیر که روی ۷۰ بیمار و برای بررسی همان ژنوتیپ ها انجام شد، حضور ژنوتیپ ۳۱ گزارش نشد و در عوض ژنوتیپ ۶ یافت شد.

در سال ۱۳۸۶ نیک اخلاق و همکارانش در بیمارستان امام خمینی اهواز بر روی ۱۷۶ بیمار مبتلا به سرطان سر و گردن تحقیق کردند. آن ها ۱۷۶ نفر را هم به عنوان گروه کنترل انتخاب نمودند. افراد گروه کنترل دارای پاتولوژی خوش خیم بودند. پس از انجام PCR تنها ۳ درصد از نمونه ها HPV مثبت شد. در سه بیمار ژنوتیپ ۱۶ و در دو بیمار ژنوتیپ ۱۸ گزارش شد. بررسی های بیشتر در اهواز نشان داد که نقش سیگار، ژنتیک و نیز تابش مستقیم نور خورشید همراه با عوامل شغلی در ایجاد این بیماری نقش مؤثرتری دارد و تأثیر عوامل ویروسی ناچیز گزارش شد [۱۵]. در حالی که در تحقیق کنونی از بین ۷۰ بیمار، تنها ۳ نمونه مثبت، آن هم با ژنوتیپ های ۶ و ۱۶ گزارش شده است.

حضور ویروس پاپیلوما در ارتباط باشد.

با انجام مراحل تعیین توالی ژنی، ژنوتیپ های ایجاد کننده سرطان سر و گردن در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه ۶-۱۱-۱۶-۳۳ و ۳۴ بررسی شد. هم تراز کردن نمونه های مثبت توسط نرم افزار MEGA5 انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR نیز توسط شرکت ژن فناوری (ایران) انجام گرفت. پس از انجام PCR و توالی یابی ژنی، پرونده های بیماران بررسی و اطلاعات دموگرافیک مورد نیاز استخراج و با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

در مطالعه حاضر که برای بررسی ژنوتیپ های شایع پاپیلوما ویروس در ایجاد سرطان دهان روی ۷۰ بیمار انجام گرفت، ۸ نمونه پس از انجام PCR و الکتروفورز مثبت شدند. توالی های نوکلئوتیدی نمونه های مثبت پس از توالی یابی توسط نرم افزار Blast⁺ در NCBI بررسی شد. پس از انجام بررسی ها نتایج زیر به دست آمد:

نمونه های مثبت حاوی ژنوتیپ های ۱۶ و ۶ بود که ۳ نمونه HPV-6 و ۵ نمونه HPV-16 بود. از سه نمونه HPV-6، یک نمونه متعلق به زن و از نمونه HPV-16، دو نمونه مربوط به نمونه های جدا شده از زنان بود ولی سایر نمونه ها مربوط به مردان بود. تمامی نمونه های جدا شده متعلق به تایپ ۶ ویروس HPV با توالی gbKT070129.1 و ویروس های تایپ ۱۶ با توالی dbjAB1889494.1 بانک ژنی NCBI صد در صد مطابقت توالی داشتند.

بحث

امروزه مطالعه روی سرطان سلول سنگفرشی به عنوان شایع ترین تومور حفره دهانی و ارتباط آن با عوامل مختلف، اساس تحقیقات گسترده ای در سراسر دنیا است [۱، ۶، ۱۳، ۲۳، ۲۴]. در این مطالعه تنوع ژنوتیپی گونه های پاپیلوما ویروس در

در سال ۱۳۸۸ هراتیان و همکارانشان در انستیتو پاستور تهران روی افراد مبتلا به نقص اتوزومال آنمی فالکونی بررسی هایی را انجام دادند تا حضور ژنوتیپ های ۱۶ و ۳۱ و ۱۸ پاپیلوما را به عنوان بالاترین عوامل خطرزا در بروز سرطان سر و گردن در این بیماران بررسی کنند. از آغازگرهای MY11a و GP5 به عنوان آغازگرهای پیشرو و از MY09a و GP6 به عنوان آغازگرهای برگشتی استفاده کردند. از سلول های حفره دهانی این افراد نمونه برداری شد و PCR انجام گرفت [۱۴]. در بین گروه اول ۱۴ مورد و در گروه دوم ۱۱ مورد HPV مثبت بودند. در خون تمام این افراد آنتی بادی بر علیه پاپیلوما ویروس وجود داشت. این نتایج نشان داد افراد مبتلا به نشانگان فالکونی به شدت در معرض ابتلا به عفونت های ناشی از HPV هستند و در این میان خطر ابتلا به ژنوتیپ های ۱۶ و ۱۸ در این افراد بیشتر است [۱۴]. در تحقیقات هراتیان اشارهای به جنسیت نشده اما نمونه های جمع آوری شده مربوط به سراسر کشور بوده است که از این بابت با تحقیق اخیر متفاوت می شود.

در سال ۱۳۹۱ مشهدی عباس و همکارانشان در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مطالعه ای توصیفی-تحلیلی انجام دادند تا ارتباط بین دو نشانگر P53 و p63 را با ویروس پاپیلوما ی انسانی در ضایعات دیسپلاستیک حفره دهان بررسی کنند. آن ها ۴۰ نمونه قالب پارافینی تهیه کردند که ۳۰ نمونه هیستوپاتولوژی دیسپلاستیک و ۱۰ نمونه موکوسل بودند. پس از رنگ آمیزی های ایمونوهیستوشیمیایی و انجام PCR، داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحلیل شد. آن ها از دو آغازگر GP5 و GP6 استفاده کردند. گرچه شدت و درصد بروز این دو عامل در دو گروه بیماران متفاوت بود ولی آن ها هیچ ارتباط معنی داری بین این عوامل با پاپیلوما ی انسانی در حفره دهانی پیدا نکردند [۲۶]. در حالی که در تحقیقات اخیر روی ۷۰ نمونه بیمار بررسی انجام شده است. پس از الکتروفورز نمونه ها با کمک نرم افزار MEGA5، نمونه ها با هم مقایسه شد و از روش تعیین توالی ژنی، ژنوتیپ نمونه ها مشخص و حضور

ژنوتیپ های مختلف بررسی شد.

با توجه به این که پاپیلوما ویروس در سطح پوست به مقدار بسیار فراوانی یافت می شود، می تواند عامل بروز سرطان های بسیاری از جمله سرطان پوست، دهان، ریه، دهانه رحم و ... باشد. بنابراین تحقیقات وسیعی در سراسر دنیا روی آن صورت گرفته است. این تحقیقات بیشترین میزان شیوع بیماری را در کشورهای آفریقایی مثل سودان و گینه نو و پس از آن در آمریکا و هندوستان نشان داد [۶، ۱۰، ۲۲-۲۵، ۲۷]. نتایج نشان دهنده آن بود که ژنوتیپ های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵ در این کشورها بیشتر از بقیه ژنوتیپ ها در ایجاد سرطان دهان نقش دارد. اما نتیجه به دست آمده در این مطالعه کاملاً مشابه نتایج آنژی پرو (Angiero) و همکارانش در آرژانتین است. گرچه آنان از روش RFLP-PCR و آغازگرهای My11 و My09 استفاده کردند ولی توانستند ژنوتیپ های ۱۶ و ۶ را در نمونه ها بیانند [۱، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۸، ۱۹، ۲۱-۲۳، ۲۵، ۲۸-۳۱، ۳۴]. البته تفاوت های به دست آمده در نتایج حاصل می تواند به تفاوت هایی از جمله تغییر در شرایط جغرافیایی، نوع تغذیه، رعایت بهداشت دهان و دندان، مصرف یا عدم مصرف سیگار، قرار گرفتن در معرض مستقیم تابش خورشید و آلودگی هوا نیز مربوط باشد. در هر حال وجود ژنوتیپ ۶ از ویروس پاپیلوما در نمونه های مثبت بیماران اشاره به راه های دیگر انتقال ویروس دارد.

با توجه به اطلاعات به دست آمده ۱۱/۴ درصد از نمونه های بافتی جداسازی شده از بیماران مبتلا به سرطان دهان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران به ویروس پاپیلوما ی HPV-6 یا HPV-16 آلوده بودند.

تشکر و قدردانی

طرح حاضر به عنوان پایان نامه کارشناسی ارشد از طرف دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه تهران مورد حمایت قرار گرفته است. همچنین مجریان لازم می دانند از پرسنل و مدیریت آزمایشگاه لیستر کمال تشکر را داشته باشند.

- [1] Sargolzaei S, Keikhaee M, Moradi A, Ghanbari M, Najmabadi H. Detection of Human Papilloma Virus DNA Genotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Dent Sch* 2005; 23(3): 438-48. (Persian)
- [2] Ishibashi M, Kishino M, Sato S, Morii E, Ogawa Y, Aozasa K, Kogo M, Toyosawa S. The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control. *Int J Clin Oncol* 2011; 16(6): 646-53.
- [3] Lill C, Komek G, Bachtiry B, Selzer E, Schopper C, Mittlboeck M, Burian M, Wrba F, Thumher D. Survival of patients with HPV-positive oropharyngeal cancer after radiochemotherapy is significantly enhanced. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123(7-8): 215-21.
- [4] Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol* 2009; 1: 22.
- [5] Heath S, Willis V, Allan K, Purdie K, Harwood C, Shields P, Simcock R, Williams T, Gilbert DC. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2012; 24(1): e18-23.
- [6] Menedenhall WM, Werning JW, Pfister DG. Treatment of head and neck cancer. In: De Vita VT, Lawrence TS, DePinho RA, Weinberg RA, eds. *De Vita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th edition, Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2011; p: 729-80.
- [7] Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(1): 24-35.
- [8] Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011; 29(32): 4294-301.
- [9] Jalouli J, Ibrahim SO, Mehrotra R, Jalouli MM, Sapkota D, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of viral (HPV, EBV, HSV) infections in oral submucous fibrosis and oral cancer from India. *Acta Otolaryngol* 2010; 130(11): 1306-11.
- [10] Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23(8): 633-41.
- [11] Lee SY, Cho NH, Choi EC, Baek SJ, Kim WS, Shin DH, Kim SH. Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39(7): 678-83.
- [12] Lacey MJ, Anson JR, Klusmann JP, Wang DH, Smith EM, Haugen TH, Turek LP. Human

- papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol* 2011; 85(4): 1645-54.
- [13] Arbabi-Kalati F, Nosratzahi T, Bameri Z, Rigi FM. Detection of Salivary Human Papilloma Viruses 16 and 18 (HPV) in Smoker Men in an Iranian Population by PCR: A Pilot Study. *Int J High Risk Behav Addict* 2014; 3(3): e18053. (Persian)
- [14] Haratian K, Mohseni Meybodi A., Zarei Moradi SH, Vosough P. Detection of high risk human papillomavirus DNA sequences in head and neck squamous cell carcinoma in Iranian fanconi anemia patients. *Cell Journal (Yakhteh)* 2010; 12(1): 43-50. (Persian)
- [15] Nikakhlagh S, Saki N, Mokvandi M, Jahanshahi J, Emadmostofi N. Detection and Typing of Human papilloma virus DNA by PCR in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in E.N.T. Ward of Ahwaz Imam Hospital. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2008; 15(2): 19-22 (Persian)
- [16] Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, Aquino G, Pedicillo MC, Cagiano S, Campisi G, Rubini C, Papagerakis S, De Rosa G, Tomesello ML, Buonaguro FM, Staibano S, Bufo P. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer* 2012; 7: 4.
- [17] Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, Ehemann C, Saraiya M, Bandi P, Saslow D, Cronin KA, Watson M, Schiffman M, Henley SJ, Schymura MJ, Anderson RN, Yankey D, Edwards BK. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst*, 2013.10(5):175-201.
- [18] Angiero F, Gatta LB, Seramondi R, Berenzi A, Benetti A, Magistro S, Ordesi P, Grigolato P, Dessy E. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res* 2010; 30(9): 3435-40.
- [19] Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rummelink M, Sirtaine N, Ernoux-Neufcoeur P, Mutijima E, Somja J, Depuydt CE, Delvenne P, Saussez S. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol* 2011; 39(1): 51-9.
- [20] Al-Swiahb JN, Huang CC, Fang FM, Chuang HC, Huang HY, Luo SD, Chen CH, Chen CM, Chien CY. Prognostic impact of p16, p53, epidermal growth factor receptor, and human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a betel nut-chewing area. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136(5): 502-8.
- [21] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2014/cancer-facts-and-figures>

- figures-2014.pdf
- [22] Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 2012; 307(7): 693-703.
- [23] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(11): 2006-11.
- [24] St Guily JL, Jacquard AC, Prétet JL, Haesebaert J, Beby-Defaux A, Clavel C, Agius G, Birembaut P, Okaïs C, Léocmach Y, Soubeyrand B, Pradat P, Riethmuller D, Mougin C, Denis F. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol* 2011; 51(2): 100-4.
- [25] Hannisdal K, Schjølberg A, De Angelis PM, Boysen M, Clausen OP. Human papillomavirus (HPV)-positive tonsillar carcinomas are frequent and have a favourable prognosis in males in Norway. *Acta Otolaryngol* 2010; 130(2): 293-9.
- [26] Mashhadi Abbass F, Moshref M, Naji SAR, Kharazi Fard MJ, Kargahi N. Evaluation of p53 and p63 expression and their correlation with HPV virus in oral dysplastic lesions. *Journal of Isfahan Dental School* 2012; 8(1): 56-67. (Persian)
- [27] Laantri N, Attaleb M, Kandil M, Naji F, Mouttaki T, Dardari R, Belghmi K, Benchakroun N, El Mzibri M, Khyatti M. Human papillomavirus detection in moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2011; 6(1): 3.
- [28] van Monsjou HS, Balm AJ, van den Brekel MM, Wreesmann VB. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? *Oral Oncol* 2010; 46(11): 780-5.
- [29] Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, Schindler JS, Chung CH, Wirth PS, Meijer CJ, Snijders PJ, Yarbrough WG, Slebos RJ. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009; 119(8): 1531-7.
- [30] Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010; 118(6-7): 422-49.
- [31] Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho Mda G, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; 76(1): 78-84.
- [32] Fazeli Z, Abadi A, Fazeli-Bavandpour FS, Kariminejad A. Burden of mortality due to oral cavity cancer in Iran. *Medical Sciences* 2014; 23(4 and 1): 28-32 (Persian)