

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 deparaffinized. 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 ژنتیکی 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 دلدار^۳، عباس اخوان سپهی^۴

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه 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- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۶۱۴۴۱۸، دانشگاه 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 ژنتیکی گوناگونی دارد. تعیین ژنتیک‌های 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 ژنتیک‌های ۱۶-۱۸-۳۴-۳۳ با کمک نرم افزار ۷ AlleleID، ۱ آغازگر سنس و ۳ آغازگر آتنی سنس منحظر (دُزره) طراحی شد. نمونه‌ها PCR شد و سپس محصول واکنش روی ژل آگارز، الکتروفورز شد. توالی نمونه‌های مشت ویروس پاپیلومای انسانی تعیین و نتایج توالی یابی توسط Blast تعیین هویت شد.

نتایج: ۸ نمونه ویروس پاپیلومای انسانی مشت 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 تنسالی است که از طریق تماس پوست با پوست یا روابط دهانی تنسالی انتشار می‌یابد. از بین نمونه‌ها، ۳ نمونه مربوط به زنان و ۵ نمونه مربوط به مردان است. بالاترین نمونه‌های مشت ویروس پاپیلومای انسانی مربوط به شهر تهران و پس از آن اسلامشهر است.

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

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

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

مقدمه

پیش سرطانی مشاهده می‌شود. این بیماری اغلب، لثه، غدد برازی، 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

بررسی تنوع ژنوتیپی ویروس پاپیلومای انسانی

به موقع و پیشگیری کننده از سرطان دهان برداشته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

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 جمع آوری 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. اسلامی‌های 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 پارافین زدایی (Deparaffinization)، اتانول، بافر لیزکننده و پروتاز در مراحل مختلفی استفاده شد و ساتریفوژ انجام گرفت. در مرحله پایانی نمونه‌ها توسط بافر شستشو (Elution Buffer) از ستون جدا شد و محلول محتوی DNA سریعاً به فریزر و دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی گراد 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 پلیمراز (PCR) روی نمونه‌ها، ابتدا ۵ آغازگر سنس و ۱۳ آغازگر آنتی‌سنس بر اساس پروتین L کسید ویروس طراحی شد. پس از منحث شدن (دزنه) 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 [۱-۳].

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، شناس 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 طیعی 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 [۱۱، 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.

اریابی 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

تهیه شد و درون تیوب های ۲۰ 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 مرحله ای 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، فرآورده های 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).

جدول ۱ آغازگرهای لازم برای تکثیر و شناسایی نمونه های HPV بر خطر

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

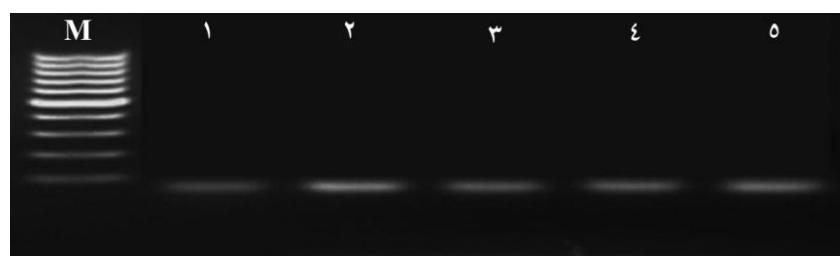
جدول ۲ مواد تشکیل دهنده واکنش PCR و میزان آنها

ترکیبات	مقادیر (میلی لیتر)
آغازگر سننس	۱
آغازگر آنتی سننس	۱
محلوط اصلی (Master mix)	۱۲/۵
الگو DNA	۱۰۰ نانو گرم
تا حجم نهایی H ₂ O	۲۵ استریل

سپس محلوط PCR در حجم ۲۵ میلی لیتر به شرح زیر



شکل ۱ تصویر نمونه های HPV تیپ ۶؛ نمونه های 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 نمونه های HPV تیپ ۱۶؛ نمونه ۱ به عنوان کنترل مثبت و نمونه های ۲، ۳، ۴ و ۵ دارای باند باز روی ژل هستند.

توالی یابی و تحلیل نتایج

نتایج نشان داد که از ۷۰ نمونه تحت بررسی، تنها ۸ نمونه مثبت شد. محصول PCR در نمونه های مثبت بر حسب نوع مثبت شد. پژوهش های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

رنوتایپ ویروس، برای 6 HPV دارای طولی معادل ۴۳۵ و برای 16 HPV طولی معادل ۴۹۲ جفت باز داشت. مثبت شدن این نمونه ها نشان می داد بروز سرطان سر و گردن می تواند باشد.

بررسی تنوع ژنوتیپی ویروس پاپیلومای انسانی

ارتباط با سرطان دهان بررسی شد. سپس ارزیابی حضور ویروس پاپیلومای 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 روش‌ها 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 ژنوتیپ‌های مختلف پاپیلوما و سرطان سر و گردن را بررسی کردند. آن‌ها قالب‌های پارافینی یافت سرطانی ۵۰ بیمار را تهیه و برای تشخیص ژنوتیپ‌های ۱۱-۳۱-۳۳-۱۸ و ۱۱ آن‌ها را بررسی کردند. از بین این نمونه‌ها 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 راپن و کشورهای اروپایی داشت. در حالی که به دلیل شباهت نزدی بین مردم ایران و شبه قاره هندوستان انتظار می‌رفت 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 ژنوتیپ‌ها 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. آن‌ها 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 نمونه‌ها HPV مثبت شد. در سه بیمار ژنوتیپ ۱۶ و در دو بیمار ژنوتیپ ۱۸ گزارش شد. بررسی‌های بیشتر در اهواز نشان داد که نقش سیگار، ژنتیک و نیز تبلش 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 ژنوتیپ‌های ۶ و ۱۶ گزارش شده است.

حضور ویروس پاپیلوما در ارتباط باشد.

با انجام مراحل تعیین توالی ژنی، ژنوتیپ‌های ایجاد کننده سرطان سر و گردن در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۶-۱۱-۱۸-۳۳-۳۴ بررسی شد. هم‌تراز کردن نمونه‌های مثبت توسط نرم‌افزار MEGA5 انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR نیز توسط شرکت ژن فناوران (ایران) انجام گرفت. پس از انجام PCR و توالی‌یابی ژنی، پرونده‌های بیماران بررسی و اطلاعات دموگرافیک مورد نیاز استخراج و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

در مطالعه حاضر که برای بررسی ژنوتیپ‌های شایع پاپیلوما ویروس در ایجاد سرطان دهان روی ۷۰ بیمار انجام گرفت، ۸ نمونه پس از انجام PCR و الکتروفورز مثبت شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه‌های مثبت پس از توالی‌یابی توسط نرم‌افزار NCBI Blast⁺ در بررسی شد. پس از انجام بررسی‌ها نتایج زیر به دست آمد:

نمونه‌های مثبت حاوی ژنوتیپ‌های 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 نمونه‌های جدا شده از زنان بود ولی سایر نمونه‌ها مربوط به مردان بود. تمامی نمونه‌های جدا شده متعلق به تایپ ۶ ویروس HPV با توالی gbKT070129.1 و ویروس‌های تایپ ۱۶ با توالی dbjAB1889494.1 با نک ژنی NCBI صد درصد مطابقت توالی داشتند.

بحث

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

ژنوتیپ‌های مختلف بررسی شد. با توجه به این که پاپیلوما ویروس در سطح پوست به مقدار بسیار فراوانی یافت می‌شود، می‌تواند عامل بروز سرطان‌های 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 [۱، ۲۵-۲۲، ۰۱]. نتایج نشان دهنده آن بود که ژنوتیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۳، ۳۱، ۳۵ در این کشورها بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها در ایجاد سرطان دهان نقش دارد. اما نتیجه به دست آمده در این مطالعه کاملاً مشابه نتایج آنژریو (Angiero) و همکارانش در آرژانتین است. گرچه آنان از روش RFLP-PCR و آغازگرهای My09 و My11 استفاده کردند ولی توانستند ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۶ را در نمونه‌ها بیابند [۱، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۸، ۱۹، ۲۱، ۲۵، ۲۳-۲۸]. البته تفاوت‌های به دست آمده در نتایج حاصل به رعایت‌هایی از جمله تغییر در شرایط جغرافیایی، نوع تغذیه، تفاوت‌هایی از جمله تغییر در شرایط جغرافیایی، نوع سیگار، 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 نمونه‌های مثبت بیماران اشاره به راه‌های دیگر انتقال ویروس دارد.

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

تشکر و قدردانی

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

در سال ۱۳۸۸ هراتیان و همکارانشان در انتیتو پاستور تهران روی افراد مبتلا به نقص اتوژومال آنمی فالکونی بررسی هایی را انجام دادند تا حضور ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۳۱ و ۱۸ پاپیلوما را به عنوان بالاترین عوامل خطرناک 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 سلول‌های 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 آنتی‌بادی بر علیه پاپیلوما ویروس وجود داشت. این نتایج نشان داد افراد مبتلا به نشانگان فالکونی بهشتند در معرض ابتلا به عفونت‌های ناشی از HPV هستند و در این میان خطر ابتلا به ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ در این افراد بیشتر است [۱۴]. در تحقیقات هراتیان اشاره‌ای به جنسیت نشده اما نمونه‌های جمع آوری شده مربوط به سراسر کشور بوده است که از این بابت با تحقیق اخیر متفاوت می‌شود.

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

منابع

- [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, Kornek G, Bachtiary B, Selzer E, Schopper C, Mittlboeck M, Burian M, Wrba F, Thurnher 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] Meneden 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, Altekruse 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] Lace MJ, Anson JR, Klussmann 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, Nosratzehi 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, Tornesello 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; 105(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, Remmeliink 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-2014.pdf>

- 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)