

Identification of Herpes Simplex Virus's DNA and RNA in the Breast Tumor, Using Polymerase Chain Reaction Technique

Keshan Dehghan A: Department of genetic, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
Ghane M: Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Corresponding Author: Masood Ghane, masoodghane@toiau.ac.ir

Abstract

Introduction: Several studies have proven that human cancer cells can develop as a result of infection with the herpes simplex virus. Regarding this observation, the presence of this virus' DNA in the paraffin tissue of breast cancer in some tumor samples can be a risk factor for the formation of breast carcinoma. The aim of this study was to investigate the frequency rate of RNA and DNA of human herpes simplex virus in fresh and paraffined breast tumor samples.

Methods: In this study, 70 fresh and paraffined breast tumor samples were collected from patients with breast cancer that were surgically treated in Golsar, Aria, and Rasoul-e-Akram hospitals on Rasht, Iran, in 2016. After rapid transfer of samples to the laboratory, RNA and DNA extraction was performed using one-stage kit (Genall, Korea), and the extracted RNA was converted to cDNA. Next, the UL30 gene of herpes simplex virus from exclusive primer was used for proliferation.

Results: Out of 70 samples of breast cancer, none was positive in the fresh and paraffined tissues. This issue indicates the absence of the genome of herpes simplex virus in the breast tumor in this study.

Conclusions: The role of herpes viruses has been proven in the formation of cervical cancers, Hodgkin's, Burkitt's lymphoma, and blood vessels cancer in the past decade. However, there is also evidence that HSV genome was not identified in tumors. Therefore, further studies are needed to understand the association of these viruses with the formation of breast tumors.

Keywords: Breast Cancer, Tumors, Herpes Simplex Virus.

شناسایی DNA و RNA ویروس هرپس سیمپلکس در نمونه‌های تومور پستان به کمک واکنش زنجیره پلیمرز

اطلس کشن دهقان: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
مسعود قانع*: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

مقدمه: مطالعات متعدد ثابت نموده‌اند که سلول‌های سرطانی انسان می‌توانند در نتیجه آلودگی به ویروس هرپس سیمپلکس به وجود آیند. با توجه به مشاهده حضور DNA این ویروس در بافت پارافینه سرطان پستان در برخی از نمونه‌های توموری این احتمال وجود دارد که ویروس هرپس سیمپلکس می‌تواند یک فاکتور خطر برای شکل‌گیری کارسینومای پستان باشد. هدف از اجرای این تحقیق بررسی میزان فراوانی RNA و DNA ویروس هرپس سیمپلکس انسانی در نمونه‌های تومور تازه و پارافینه شده پستان می‌باشد.

روش بررسی: در این بررسی ۷۰ نمونه تازه و پارافینه شده تومور پستان از بیماران مبتلا به سرطان پستان که در بیمارستان‌های گل‌سار، آریا و رسول اکرم (ع) رشت در سال ۱۳۹۵ جراحی شده، بودند جمع‌آوری گردید. پس از انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج RNA و DNA با استفاده از کیت (Genall Korea) انجام گردید. سپس با استفاده از کیت یک مرحله‌ای (Genall Korea)، RNA استخراجی به cDNA تبدیل گردید. در ادامه به منظور تکثیر ژن UL30 ویروس هرپس سیمپلکس از پرایمر اختصاصی، استفاده شد.

یافته‌ها: در مجموع از ۷۰ نمونه سرطان پستان هیچ نمونه مثبتی در بررسی بافت تازه و پارافینه مشاهده نشد که این مسئله نشان‌دهنده عدم حضور ژنوم ویروس هرپس سیمپلکس در تومور پستان در این تحقیق می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در حدود یک دهه است که نقش هرپس ویروس‌ها در شکل‌گیری سرطان‌های سرویکس، هودچکین، لنفوم بورکیت و سرطان عروق خونی ثابت شده است. با این حال شواهدی نیز وجود دارد که موفق به شناسایی ژنوم ویروس HSV در تومورها نشده‌اند از این رو مطالعات بیشتر برای درک ارتباط این ویروس‌ها با شکل‌گیری تومورهای سینه نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، تومور، ویروس هرپس سیمپلکس، PCR.

* نشانی نویسنده مسئول: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، مسعود قانع.

نشانی الکترونیک: masoodghane@toniau.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان رشد مهار نشده سلول‌های غیرطبیعی است که در نواحی مختلف پستان ایجاد می‌شود (۱). این سرطان دومین شایع در میان زنان است و انواع متعددی چون LCIS (کارسینوم لپکی در جا)، DCIS (کارسینوم مجرای در جا) و کارسینوم مهاجم تقسیم می‌شود (۲). سرطان پستان یک بیماری به شدت ناهمگن است که در اثر تأثیر متقابل عوامل خطر وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و به تجمع پیشرونده تغییرات ژنتیک و اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطان پستان منجر می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عوامل خطر ویژه (مانند سن، چاقی، مصرف الکل، برخورد با استروژن در طول زندگی) تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان پستان قوی‌ترین عامل خطر برای این بیماری به شمار می‌آید. تقریباً ۲۰٪ سرطان‌های پستان را انواع خانوادگی تشکیل می‌دهند و از نظر بیماری‌زایی، وابستگی خاصی به ژن مستعدکننده ویژه آن بیماری دارد (۳). حدود نیمی از سرطان‌های خانوادگی در اثر جهش در دودمان زایشی ژن‌های سرکوبگر تومور (TSGs) رخ می‌دهند که نقش اغلب آنها حفظ درستی و تمامیت ژنوم است. جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 موجب عدم شباهت ژنوم می‌شوند که خود به تغییرات در ژن‌های کلیدی دیگر شامل ژن‌های سرکوبگر تومور یا انکوژن‌ها منجر می‌شود (۴).

خطر ابتلا به سرطان پستان با افزایش سن بیشتر می‌شود. در حدود ۳/۴ از موارد بیماری در زنان بالای ۵۰ سال ایجاد می‌شود. سرطان پستان در زنانی که در سنین پایین در معرض پرتوتابی قرار گرفته‌اند، زنانی که قاعدگی آنها در سنین پایین شروع شده و یا دیرتر یائسه شده‌اند، افرادی که باردار نشده‌اند یا زنانی که اولین فرزندان آنها بعد از ۳۰ سالگی دنیا آمده است شیوع بیشتری دارد (۵). مطالعات صورت گرفته در گذشته نقش ویروس‌ها را در ایجاد سرطان، ثابت نموده است به عنوان مثال نقش ویروس هرپس سیمپلکس، سائیتومگالو، ابشتین بار و کاپوشی سارکوما به ترتیب در سرطان‌های سرویکس، هودچکین، لنفوم بورکیت و سرطان عروق خونی ثابت شده است همچنین نقش پاپیلوما ویروس در سرطان سرویکس و پوست، HTLV در لوسمی و HBV در سرطان کبد پیش از این ثابت شده بود (۶). خانواده هرپس ویروس‌ها یکی از

ویروس‌های تومورزایی است که طبق شواهد موجود می‌تواند در سرطان پستان نقش داشته باشد، این ویروس‌ها جز ویروس‌های DNA دار هستند، DNA آنها از نوع دو رشته‌ای است با تقارن مکعبی و دارای پوشش از جنس لیپید است (۷). چرخه تکثیر هرپس سیمپلکس ویروس سریع است به طوری که حدود ۸ تا ۱۶ ساعت طول می‌کشد (۸).

هدف از اجرای این مطالعه شناسایی ژنوم ویروس هرپس سیمپلکس انسانی با استفاده از تکنیک مولکولی PCR در نمونه‌های تومور تازه و پارانینه شده تومور پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی که بر روی ۷۰ نمونه بافت تومور پستان تازه و ۷۰ نمونه پارانینه شده همان بیماران، صورت پذیرفت، نمونه‌ها از بیمارستان‌های گل‌سار، آریا و رسول اکرم (ص) در سال ۱۳۹۵ در شهر رشت جمع‌آوری گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA: تکنیک استخراج RNA از بافت طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Catt.NO:305-101) اجرا شد. پس از استخراج RNA از بافت، سنتز cDNA با استفاده از کیت تک مرحله‌ای اجرا گردید و به این منظور از پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن UI30 که از مقاله (۹) استخراج شده و توسط شرکت تک کوپنهاگن دانمارک سنتز گردید، استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر میکس PCR، ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (جدول ۱) به همراه ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۳ میکرولیتر از RNA استخراجی است. سپس مخلوط واکنش به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفت تا cDNA سنتز گردد.

استخراج DNA از بافت تازه و پارانینه: به منظور دیپارانینه کردن، ابتدا از بلوک‌های پارانینه برش‌های ۵ میکرونی تهیه گردید. سپس به منظور حذف پارانینه نمونه‌ها در محلول زایلن قرار داده شدند و به منظور آبگیری به ترتیب در اتانول ۱۰۰ و ۸۰ و ۶۰ و ۴۰ درصد قرار گرفتند. در نهایت برای اجرای فرآیند استخراج DNA بافت‌ها، از کیت استخراج DNA شرکت Geneall (Cat.NO: 305-101) استفاده شد. سپس

آلمان) قرار داده شد و واکنش زنجیره پلیمرز با برنامه زمانی و دمایی که در جدول ۲ قابل مشاهده است، اجرا شد.

تکثیر ژن UL30 ویروس هرپس سیمپلکس: به منظور تکثیر ژن UL30 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲، ابتدا مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مطابق روش بالا تهیه و واکنش زنجیره پلیمرز با برنامه زمانی و دمایی که در جدول ۳ قابل مشاهده است، اجرا شد.

آنالیز کیفی: آنالیز کیفی به کمک ژل آگارز و سیستم الکتروفورزیس انجام می شود. برای این منظور نمونه‌ها بعد از PCR برای بررسی نهایی روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شد و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور محصول PCR مشاهده گردید.

آنالیز کمی به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر: به منظور تعیین حداقل غلظت DNA قابل تشخیص DNA ویروس، ابتدا غلظت اولیه با دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین و بعد از تهیه رقت‌های متوالی با برنامه دمایی و زمانی فوق الذکر، پلی‌مریزاسیون ژن UL30 انجام شد.

به منظور بررسی خلوص DNA استخراج شده آنالیزی مبتنی بر جذب DNA استخراجی در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت.

تکثیر ژن بتاگلوبین انسانی: به منظور اطمینان از قابل PCR بودن DNA استخراج شده، تکثیر ژن بتاگلوبین انسانی با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن بتاگلوبین انسانی که از مقالات علمی استخراج شده است، اجرا گردید. به منظور تکثیر ژن بتا گلوبین انسانی، ابتدا ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix به همراه ۶ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (جدول ۱) به همراه ۴/۵ میکرولیتر DNA استخراجی داخل یک میکروتیوب استریل ۰/۲ ریخته و به صورتی که حجم نهایی برابر با ۲۵ میکرولیتر گردد. برای کنترل مثبت از نمونه‌ای که با تکنیک PCR سکوانسینگ، ویروس هرپس سیمپلکس تشخیص داده شده بود، از آزمایشگاه ویروس شناسی کیوان اخذ گردید. برای کنترل منفی تمام مقادیر درون میکروتیوب منتقل شد اما به جای نمونه مقدار ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. سپس میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف-

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی	سایز قطعه تکثیری	رفرانس
HSV F	5'CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGA3'	476 bp	۹
HSV R	5'GTAGATGGTGCGGGTGATGTT3'		
Beta F	5'ATAGACCAATAGGCGAGAGTCA3	122 bp	۱۰
Beta R	5'GGAATTTGGACAGAACATTGGAACT3'		

جدول ۲: برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر ژن بتا گلوبین

تعداد سیکل	برنامه
۱ سیکل	تقلیب اولیه
۳۵ سیکل	تقلیب ثانویه
۱ سیکل	اتصال پرایمرها
۱ سیکل	طویل سازی
۱ سیکل	طویل سازی نهایی

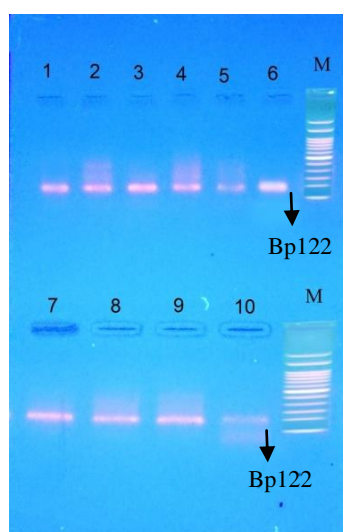
جدول ۳: برنامه زمانی و دمایی PCR برای ژن UL30 ویروس هرپس سیمپلکس

تعداد سیکل	برنامه
۱ سیکل	تقلیب اولیه
۴۵ سیکل	تقلیب ثانویه
	اتصال پرایمرها
	طویل سازی
۱ سیکل	طویل سازی نهایی

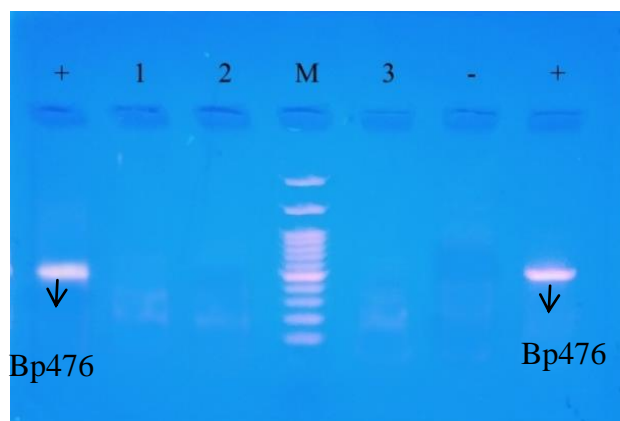
یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک بیماران: با توجه به اطلاعات دموگرافیکی که از طریق مطالعه پرونده بیماران بدست آمد از ۷۰ بیماران مورد بررسی سن اکثر بیماران بین ۴۰ تا ۵۰ سال (۴۱/۴۳٪) و کمترین آنها زیر ۴۰ سال (۱۰٪) است. از لحاظ گروه خونی اکثر بیماران دارای گروه خونی O+ (۳۷/۱۴٪) و کمترین آنها AB- (۴/۲۹٪) است. از این تعداد ۵۶ مورد با درصد فراوانی (۸۰٪) سابقه قند خون نداشته و تعداد ۱۴ مورد با درصد فراوانی (۲۰٪) سابقه قند خون دارند. از ۷۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۴۸ مورد با درصد فراوانی (۶۸/۵۷٪) سابقه فامیلی سرطان پستان نداشته و تعداد ۲۲ مورد با درصد فراوانی (۳۱/۴۳٪) سابقه فامیلی سرطان پستان دارند. از لحاظ قند خون تعداد ۵۶ مورد با درصد فراوانی (۸۰٪) سابقه قند خون ندارند و تعداد ۱۴ مورد با درصد فراوانی (۲۰٪) سابقه دارند.

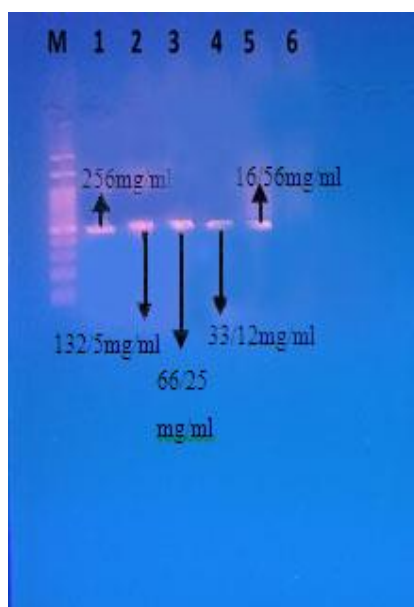
نتیجه تکثیر ژن بتاگلوبین انسانی: جهت تایید حضور DNA و قابل PCR بودن آن از پرایمر اختصاصی جهت تکثیر ژن بتا گلوبین انسانی استفاده گردید. مشاهده قطعه ۱۲۲ bp نشان‌دهنده تکثیر قطعه ای از ژن بتا گلوبین انسانی است. از ۷۰ نمونه مورد بررسی بر روی DNA استخراجی از بافت تومور پستان هیچ نمونه مثبتی که حاکی از حضور این ویروس در تومور باشد مشاهده نشده است. همچنین در بررسی که بر روی RNA استخراجی از بافت توموری که به منظور تشخیص اینفیلتراسیون لنفوسیتی صورت گرفت نیز هیچ نمونه مثبتی مشاهده نشد. در نتیجه توزیع فراوانی ویروس در بافت تومور همه بیماران مبتلا به سرطان پستان منفی می‌باشد. این نتیجه حاکی از عدم ارتباط بین این ویروس و کارسینوم پستان می‌باشد. تکثیر ژن UL30 ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲: مشاهده قطعه ۴۷۶ bp نشان‌دهنده تکثیر ژن UL30 ویروس است.



تصویر ۱: تکثیر ژن بتاگلوبین انسانی. M: سایز نشانگر استاندارد با وزن ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ۱ تا ۱۰ نمونه‌های مورد بررسی



تصویر ۲: تکثیر ژن UL30 ویروس M: سایز نشانگر استاندارد با وزن ۱۰۰ جفت بازی، نمونه کنترل مثبت که در bp ۴۷۶ باند داده است، نمونه کنترل منفی، چاهک‌های ۱ تا ۳ نمونه‌های مورد بررسی



تصویر ۳: بررسی غلظت DNA رقیق شده نمونه کنترل مثبت برای آنالیز کمی M: سایز نشانگر استاندارد با وزن ۱۰۰ جفت بازی

در این تحقیق که به منظور بررسی حضور و مقایسه میزان فراوانی RNA با DNA ویروس هرپس سیمپلکس در ۷۰ نمونه‌های تازه و پارافینه تومور پستان صورت گرفت تا از تاثیر حضور این ویروس بر روی سرطان پستان اطمینان حاصل شود هیچ نمونه مثبتی مشاهده نشد که این امر نشانگر عدم حضور این ویروس در سرطان پستان می‌باشد. با توجه به اینکه در این تحقیق علاوه بر بافت پارافینه، بافت تازه هم مورد بررسی قرار گرفته است امکان خطا به علت آلودگی در اثر تماس با محیط بسیار پایین است و به علت بررسی RNA در صورت وجود اینفیلتراسیون لنفوسیتی امکان شناسایی وجود داشت. تی سای و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش نمودند که HSV1 با تومور خوش خیم پستان (فیبرآدنوما) رابطه

بحث

سرطان از بیماری‌های مزمن و بسیار خطرناک است که سلامت افراد را در سن‌های مختلف به خطر می‌اندازد و بر جسم و روان افراد و اجتماع تاثیرات جبران ناپذیری می‌گذارد (۱۰).

برای زنان هیچ سرطانی نگران‌کننده‌تر از سرطان پستان نیست. این بیماری شایع‌ترین علت مرگ زنان در سن ۵۰ تا ۴۰ سالگی است (۱۱).

مطالعات صورت گرفته در دو دهه اخیر نقش ویروس‌ها را در ایجاد سرطان ثابت نموده است. مطالعات متعدد ثابت نموده که سلول‌های سرطانی انسان می‌تواند آلوده به ویروس HSV1 باشد (۱۲).

و II بر سرطان پستان دانست. تعداد کمی مطالعات هم در زمینه تاثیر ویروس هرپس تیپ V (CMV) در سرطان پستان با استفاده از تکنیک PCR انجام شده است که از مجموع ۷ مورد مطالعه، ۶ مورد از لحاظ حضور این ویروس مثبت اعلام شدند (۳۰-۳۳) و تنها یک مورد مطالعه منفی اعلام شد (۳۴).

پژوهش حاضر حاکی از عدم ارتباط ویروس HSV با سرطان پستان می‌باشد با این وجود تحقیقات دیگری در زمینه ارتباط ویروس هرپس سیمپلکس با ایجاد سرطان در سایر اعضا بدن صورت پذیرفت که در این پژوهش‌ها نیز ارتباط معناداری بین این ویروس و سرطان زایی یافت نشد، به عنوان مثال هایدشیم و همکارانش نشان دادند که اگرچه عفونت HSV2 از یک میزان بالایی در نئوپلازیای سرویکس برخوردار است (۳۵). با این وجود این ویروس نمی‌تواند به طور مستقیم در فرایند انکوژنیک نقش داشته باشد (۳۶). همان‌طور که در این پژوهش گفته شده و با پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد این ویروس نمی‌تواند به طور مستقیم در فرایند انکوژنیک نقش داشته باشد. مطالعات صورت گرفته تا کنون ارتباط مستقیم بین این ویروس و تومورزایی پستان را ثابت نکرده است. پیشنهاد می‌شود با توجه به قابلیت سرطان‌زایی، ویروس‌های دیگر خانواده هرپس مورد بررسی قرار گیرند. همچنین به منظور تایید نتایج حاصله از تکنیک ساترن بلات یا هیبریداسیون DNA استفاده شود. از طرفی با توجه به پراکندگی متفاوت ویروس در نقاط مختلف کشور این پژوهش به صورت گسترده‌تر و در نقاط دیگر کشور نیز صورت پذیرد.

نتیجه گیری

با توجه به عدم مشاهده ویروس HSV در هیچ یک از بیماران مورد مطالعه و همچنین با استنباط از سایر پژوهش‌های صورت گرفته می‌توان بیان داشت که این ویروس در ایجاد سرطان پستان (کارسینوما) نقش نداشته و هیچگونه ارتباط معناداری بین این ویروس و سرطان‌زایی یافت نشده است البته با توجه به حضور سایر تیپ‌های هرپس ویروس در سرطان پستان و وجود نتایج تایید کننده توسط سایر پژوهش‌های صورت گرفته نمی‌توان از تاثیر تیپ IV و V هرپس ویروس‌ها در سرطان‌زایی صرف‌نظر کرد.

داشت اما در تومورهای بدخیم پستان این رابطه مشاهده نشده است (۱۳). از این رو این ویروس به عنوان فاکتور خطر در ایجاد این نوع تومور معرفی گردید. از آنجایی که در پژوهش حاضر تمامی نمونه‌ها از نوع کارسینوم بودند این امر نتایج تی سای را محتمل نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط اقبالی و همکارانش بر روی ۲۴ نمونه کارسینوم و ۲۴ نمونه فیبرآدنوم انجام شد در مجموع ۲ نمونه در نمونه‌های کارسینوم و ۲ نمونه در نمونه‌های فیبرآدنوم به ویروس HSV آلوده بودند. در این تحقیق فقط از نمونه‌های پارافینه استفاده شده و تکنیک مورد استفاده PCR بوده است (۱۴). علت اختلاف بین نتایج اقبالی و این پژوهش با توجه به اینکه محل نمونه‌گیری اقبالی از بیمارستان فیروزگر تهران بوده و فقط از بافت پارافینه استفاده شده است این امکان وجود دارد که به علت پراکندگی متفاوت ویروس در نقاط مختلف کشور یا وجود نمونه‌های مثبت به علت آلودگی در اثر تماس با محیط در هنگام پارافینه کردن یا مراحل انتقال در آزمایشگاه بیمارستان یا محل استخراج باشد.

در مطالعه‌ای که توسط کلر و همکارانش به منظور مقایسه افراد مبتلا به سرطان خوش‌خیم پستان با افراد سالم انجام شد، نشان داد که HSV1 ارتباط نزدیکی با نوع خوش‌خیم سرطان پستان از نوع خانوادگی دارد (۱۵). با توجه به بدخیم بودن نمونه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر و با توجه به نتایج حاصل از پژوهش تی سای نتایج به دست آمده توسط کلر محتمل می‌باشد.

از دیگر جنس‌های خانواده هرپس ویریده که نقش آنها در سرطان پستان ثابت شده ویروس EBV است. از ۳۲ مورد مطالعه‌ای که به منظور بررسی تاثیر ویروس هرپس تیپ IV (EBV) در سرطان پستان با استفاده از تکنیک PCR انجام شد، ۲۲ مورد مطالعه از لحاظ حضور این ویروس مثبت اعلام شد (۱۶-۲۴) و ۱۰ مورد مطالعه منفی اعلام شد (۲۵-۲۹). با توجه به تعداد بالای نتایج مثبت گزارش شده این احتمال وجود دارد که این تیپ از خانواده هرپس در سرطان‌زایی نقش داشته باشند، اگرچه این پژوهش‌ها از لحاظ تکنیک مورد استفاده با پژوهش حاضر مطابقت دارد ولی از آنجایی که هیچ کدام به تاثیر حضور HSV1 یا HSV2 از خانواده هرپس ویریده نپرداخته است نمی‌توان آن را دلیلی بر تاثیر هرپس تیپ I

References

1. Parkin M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *Lancet oncol* 2001; 2:533-43.
2. Seedhom A, Kamal N. Factors affecting survival of women diagnosed with breast cancer. *International journal of preventive medicine* 2011; 2(3): 131-38.
3. Antonio A, Easton D. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *oncogene* 2006; 25(43): 898-905.
4. Walsh T, King M. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* 2007; 11:103-5.
5. Honrado E, Benitez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005; 18: 1305-20.
6. Hennig E, Dilonrado A, Venuti A, Holm R, Marcanete M, Nesland J. HPV 16 in multiple neoplastic lesions in women with CINIII. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18:369-77.
7. Jarzab M. Optimization of the Method of RNA Isolation from Paraffin Blocks to Assess Gene Expression in Breast Cancer. *Pol J Pathol* 2008; 59(2): 85-91.
8. Jawetz A. *Medical microbiology*. Geo: California 2007.
9. Ergazaki M, Xinarianos G, Giannoudis A, Markomichelakis N, Tsampralakis J, Spandidos D. Detection of HSV, CMV and EBV by the polymerase chain reaction technique in patients with inflammatory eye diseases. *Oncology reports* 1994; 1207-10.
10. Zaravinos A, Bizakis J, Spandidos A. Prevalence of papilloma virus and Human herpes virus type 1-7 in human nasal polyposis. *Journal of Medical virology* 2009; 81:1613-18.
11. Parker S, Tong T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1997; 47(2):5-27.
12. Cotron S, Rabbits R. *Pathologic basis of disease 7th ed*. Philad: united state 1999.
13. Yang Y, Koh L, Tsai C, Wong E, Lin S, Yang C. Correlation of viral factors with cervical cancer in Taiwan. *Microbiol Immunol Infect* 2004; 37:282-87.
14. Tsai J, Tsai C, Cheng M, Lin S, Xu F, Yang C. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *Journal of medical virology* 2005; 75(2): 276-81.
15. Eghbali M, Ghane M, Mirinargesi M. Frequency of cytomegalovirus (CMV) in benign and malignant tumors. *Molecular and Clinical Microbiology* 2012; 2:175-79.
16. Kleer C, Tseng M, Gutsch D, Rochford R, Wu Z, Joynt L, Helvie M, Chang T, VanGolen K, Merajver S. Detection of Epstein-Barr virus in rapidly growing fibroadenomas of the breast in immunosuppressed hosts. *Mod Pathol* 2002; 15:759-64.
17. Tsai J, Tsai C, Cheng M, Lin S, Xu F, Yang C. Association of viral factor with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous; fibroadenoma and thyroid tumor tissue. *J Med* 2005; 75:276-81.
18. Bonnet M, Guinebretiere J, Kremmer E. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91:1376-81.
19. Fina F, Romain S, Ouafik L, Palmari J, Ayed F, Benharkat S. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer* 2001; 84(6):783-90.
20. Xue S, Lampert I, Haldane J, Bridger J, Griffin B. Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer: protagonist or passenger. *Br J Cancer* 2003; 89(1):113-19.
21. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone J. Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(2): 332-37.
22. Perkins R, Sahm K, Marando C, Dickson-Witmer D, Pahnke G, Mitchell M. Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast

- cancer primary biopsy specimens by real time PCR. *Breast cancer research: BCR* 2006; 8(6):R70.
23. Hachana M, Amara K, Ziadi S, Romdhane E, Gacem RB, Trimeche M. Investigation of Epstein-Barr virus in breast carcinomas in Tunisia. *Pathology, research and practice* 2011; 207(11):695-700.
 24. Horiuchi K, Mishima K, Ohsawa M, Aozasa K. Carcinoma of stomach and breast with lymphoid stroma: localisation of Epstein-Barr virus. *J Clin. Pathol* 1994; 47: 538-40.
 25. Glenn W, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker N, Lawson J. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PloS one* 2012; 7(11):e48788.
 26. Perrigoue J, Boon J, Friedl A, Newton M, Ahlquist P, Sugden B. Lack of association between EBV and breast carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 2005; 14(4): 809-14.
 27. Morales A, Molina T, Martinez J, Hernandez P, Mantilla A, Leal Y. No association between Epstein- Barr Virus and Mouse Mammary Tumor Virus with breast cancer in Mexican women. *Scientific reports* 2013; 3:2970.
 28. Antonsson A, Bialasiewicz S, Rockett R, Jacob K, Bennett I, Sloots T. Exploring the prevalence of ten polyomaviruses and two herpes viruses in breast cancer. *PloS one* 2012; 7(8):e39842.
 29. Gaffey M, Frierson H, Medeiros L, Weiss L. The relationship of Epstein-Barr virus to infection-related (sporadic) and familial hemophagocytic syndrome and secondary (lymphoma-related) hemophagocytosis: an in situ hybridization study. *Human pathology* 1993; 24(6):657-67.
 30. Baltzell K, Buehring G, Krishnamurthy S, Kuerer H, Shen H, Sison J. Epstein-Barr virus is seldom found in mammary epithelium of breast cancer tissue using in situ molecular methods. *Breast cancer research and treatment* 2012; 132(1):267-74.
 31. Tsai J, Tsai C, Cheng M, Lin S, Xu F, Yang C. Association of viral factor with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous; fibroadenoma and thyroid tumor tissue. *J Med* 2005; 75:276-81.
 32. Harkins E, Matlaf L, Soroceanu L, Klemm K, Britt W, Wang W, Bland K, Cobbs C. Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae* 2010; 1(8):1-10.
 33. Taher C, Boniface J, Mohammad A, Religa P, Hartman J, Yaiw K. High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes. *PloS one* 2013; 8(2):e56795.
 34. Eghbali M, Ghane M, Mirinargesi M, Zare mehrjadi A. Detection of herpes simplex virus (Hsv2) among benign and malignant breast tumor . *Asian journal of Biological Sciences* 2012; 153-57.
 35. Antonsson A, Bialasiewicz S, Rockett R, Jacob K, Bennett I, Sloots T. Exploring the prevalence of ten polyomaviruses and two herpes viruses in breast cancer. *PloS one* 2012; 7(8):e39842.
 36. Hildesheim A, Mann V, Brinton L, Szklo M, Reeves W, Rawls W. Herpes simplex virus type 2: A possible interaction with human papilloma virus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1991; 49:335-40.
 37. Yang Y, Koh L, Tsai J, Tsai C, Wong E, Lin S, Yang C. Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan. *Jpn J Clin. Oncol* 2004; 34:176-83.