

# راه اندازی فن PCR برای تشخیص آلدگی به ویروس HTLV-1 در بافت‌های پارافینه

دکتر محمود محمودی<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا خوبی<sup>۲</sup>، دکتر مهدی فرزادنیا<sup>\*</sup><sup>۳</sup>، مریم راستین<sup>۴</sup>

## چکیده

مقدمه: ویروس HTLV-1 اولین رتروویروس شناخته شده انسانی و جزء خانواده انکوویروس‌ها است. ویژگی مهم این ویروس محدودیت شیوع جغرافیایی آن است و شمال خراسان یکی از مناطق آندمیک آلدگی به ویروس HTLV-1 می‌باشد. مطالعات اپیدمیولوژی و بررسی انتشار آلدگی می‌تواند در طراحی روش‌های پیشگیری مؤثر باشد. پژوهش حاضر با هدف راه اندازی فن PCR (Polymerase Chain Reaction) برای اولین بار در ایران، برروی بافت‌های پارافینه جهت بررسی آلدگی به ویروس HTLV-1 انجام شده است. این روش زمینه را برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی در راستای مشخص کردن جغرافیایی و به ویژه تاریخی آلدگی و نیز بررسی الگوهای انتشار آن فراهم می‌آورد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی به صورت آزمایشگاهی به منظور تثیت تکنیک است. ابتداجستجوی ژن بتاکتین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوطه بر روی نمونه‌های بافتی پارافینه از اعضای مختلف مانند کبد، طحال، پوست و گره لنفی که از بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان امام رضا(ع) مشهد استخراج گردیده بود صورت پذیرفت. غلظت اپتیمال کلرید منیزیم ۲ میلی مول و پرایمر ۸ پیکو مول بود. غلظت بهینه DNA برای بلوک‌های بافتی مختلف، متفاوت بود. پس از آن PCR با پرایمرهای tax، env و pol با LTR ژنوم ویروس HTLV-1 بر روی ۵۰ مورد بافت پارافینی گره لنفی انجام شد. و تکرار پذیری تکنیک روی بافت‌های پوست و گره لنفی آلدگی به HTLV-1 نشان داده شد.

نتایج: بین ۵۰ مورد بافت‌های مربوط به گره‌های لنفی در یک مورد بیمار مبتلا به لنفوم غیرهوچکینی با پنج سری پرایمر (دوسری برای قطعه Tax و یک سری برای قطعات LTR, Env, Pol) در نواحی مربوط به هر کدام ایجاد باند نمود. یک مورد دیگر مربوط به یک بیمار با لنفوم غیرهوچکینی تهبا با دوسری پرایمر Tax مثبت بوده و با سایر پرایمرها باندی ایجاد نکرد. با احتساب مورد اول (به سبب قطعیت آلدگی به HTLV-1) درصد شیوع در بافت‌های پارافینی گره‌های لنفی ۲ درصد می‌باشد. در صورت محاسبه مورد دوم شیوع آلدگی به ۴ درصد افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری: مقایسه میزان آلدگی بافتی در این مطالعه با شیوع سرولوژیک نمونه‌های خون (۲/۳ درصد) مطالعه دیگر از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان نداد و نتایج یکدیگر را تأیید کردند ( $P=0.883$ ).

## واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره ای پلیمراز، ویروس HTLV-1، لنفوم، استخراج DNA

### مقدمه

تاریخ حیات بشری و سیرتتحول علم همگام با فعالیت‌ها و

۱- دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی

۲- دانشیار گروه آسیب شناسی

۳- نویسنده مسئول: استادیار گروه آسیب شناسی تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۴۸۷۸

Email : mhdifarzadnia@yahoo.com

۴- دانشجوی دکترای ایمونولوژی - مرکز تحقیقات ایمونولوژی

۵- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۴/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۱۰/۲۸

تحقیقاتی است که انسان برای غلبه بر بیماری‌ها و افزایش طول عمر داشته است. از جمله فعالیت‌هایی که در این مسیر انجام شده تحقیقاتی است که از سال ۱۹۰۹ با ارایه شواهدی از ارتباط ویروس و سرطان توسط آقای Rous شروع شده و به صورت مداوم امتداد یافته و در سال ۱۹۷۸ منجر به کشف ویروس لنفوتروپ انسانی نوع HTLV-1 (T) شده است. مطالعات اپیدمیولوژی در بسیاری از موارد از جمله آلدگی به ویروس‌ها نظری HTLV-1 می‌تواند در طراحی

قابل اعتماد نبوده و میزان شکست آن را بین ۲۱۰٪ تا ۳۱٪ ذکر کرده اند.<sup>(۵)</sup> اما با توجه به اینکه نمونه های بافتی بیماران در بایگانی بخش های آسیب شناسی برای مدت طولانی (تایم قرن) قابل نگهداری بوده و امکان مطالعات فراوان روی آنها وجود دارد لذا این تحقیق جهت راه اندازی و تثبیت استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction) برای تشخیص آلودگی بافت های پارافینه به عوامل عفونی مانند HTLV-1 طراحی شده است، با این امید که مطالعات ملکولی بر روی نمونه های بافتی قدیمی بتواند ما را در یافتن کانونهای اصلی عفونت و تخمین زمان احتمالی پیدا شیوه آن رهگشای باشد. اهداف اختصاصی این تحقیق علاوه بر راه اندازی این روش، تعیین میزان شیوع آلودگی به HTLV-1 در بافت های پارافینه و مقایسه شیوع آلودگی بافتی با آمار ارایه شده در نمونه های سرمی و نیز ایجاد زمینه تحقیقات اپیدمیولوژی ملکولی در مورد ویروس HTLV-1 است.

### روش بررسی

۱- تهیه نمونه: ابتدا پرایمر های مورد نیاز برای تکثیر توالی ژنوم ویروس HTLV-1 تهیه شدن. برای اطمینان از نداشتن مشابهت بین توالی پرایمرها با سایر توالیهای ژنتیکی موجود از اطلاعات موجود در بانک ژنتیکی (National Center Biological Institute) NCBI افراری بلاست (Blast) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل دو سری پرایمر برای قطعه tax به نام های [HT-2, HT-1] و (HP-4, HP-1) و یک سری برای pol (LTR) و (HT-1, HT-4) بودند (شرکت Roche). جهت تعیین صحت عملکرد پرایمرها از نمونه خون متعلق به یک فرد با تشخیص قطعی ATLL استفاده شد.

روش های پیشگیری بیماری مؤثر باشد. از روش های نوین مطالعات اپیدمیولوژی استفاده از روش های ملکولی است.

ویروس لنفوتروپ انسانی نوع T اولین رتروویروس شناخته شده انسانی است که ایجاد بدخیمی لنفوسمیت های سلول T بالغین (Adult Tcell Lymphoma/ Leukemia (HAM/TSP)) و سایر بیماریها را می نماید که از نظر فیلوژنیک به گروه بین قاره ای (Cosmopolitan) زیر گروه A تعلق دارد.<sup>(۱)</sup> محدودیت جغرافیایی این ویروس و بیماریهای همراه آن انگیزه انجام تحقیقات گسترش اپیدمیولوژی بر روی این ویروس در دنیا بوده است. در ایران نیز، خراسان به عنوان یک منطقه اندمیک با شیوع بالا (۲/۳٪) در دنیا شناخته شده است.<sup>(۲)</sup>

روشهای شناسایی ردیابی اسیدنوکلئیک ویروس با استفاده از هیبریداسیون ساترن بلات و هیبریداسیون درجا و PCR است. PCR از این بین، جهت تشخیص قطعی جایگاه ویژه ای دارد. از امتیازات این روش سرعت، حساسیت، عملکرد انتخابی، صحت و تکرار پذیری آن است.<sup>(۳)</sup> روش PCR در حال حاضر یکی از روش های مهم برای تشخیص سرطان یا جهش های نادر ژنی می باشد. با انجام برخی تغییرات روی تکنیک اصلی PCR روش هایی برای تشخیص آلل های موتسایون یافته در جمعیت فراوانی از آلل های وحشی به کمک Allel-specific PCR و یا تشخیص سلولهای سرطانی گردشگر در خون (Immunobeaded RT-PCR) به وجود آمده است. این تکنیک جای خود را برای تشخیص مولکولی انگل هایی مثل توکسوپلاسمای یا سایر عوامل عفونی نظیر هلیکوبکتر پیلوری نیز به خوبی باز نموده است.<sup>(۴)</sup>

گرچه برخی ادعای نموده اند که انجام PCR بر روی چنین نمونه هایی

جدول (۱): مشخصات پرایمر های مورد استفاده در PCR ویروس HTLV-1

پرایمر	توالی									
HT-1 sence	7346	GGA	TAC	CCA	GTC	TAC	GTG	T	7364	
HT-2 anti sence	7503	GAG	CCG	ATA	ACG	CGT	CCA	TCG	7483	
HT-4 anti sence	7712	GGT	CTG	GAA	AAG	AGA	GGG	TTG	7692	
HP-1 sense	4744	CCC	TAC	AAT	CCA	ACC	AGC	TCA	G	4765
HP-4 anti sense	4993	AAT	ACC	AAT	GGG	TTT	GTT	TA		4974
BA-1 sense	835	CCT	TCC	TGG	GCA	TGG	AGT	CCT	G	856
BA-2 anti sense	1036	GAA	GAT	CAA	GAT	CAT	TGC	TCC		1016
HT-1 +HT-2 =158 bp	tax				HT-1 +HT-4 =367 bp	tax				
HP-1 +HP-4 =250 bp	pol				BA-1 +BA-2 =202 bp	beta- actin				

ثبت در نظر گرفته و با مقادیر متفاوت DNA برای هر کدام از بافت‌ها PCR با تعداد سیکل ۴۵ انجام شد.(جدول ۲) پس از تثبیت روش و بهینه سازی مواد مورد استفاده در PCR، آزمایشات بعدی جهت ردیابی ژنوم ویروس HTLV-1 در DNA در تعدادی از نمونه‌های بلوک پارافینی پوست و گره لفی طراحی شدند. با استفاده از پرایمرهای Tax, Pol و با مقادیر متفاوت الگو (Template) که برای نمونه‌های پوست ۳/۵ و ۵ میکرولیتر و برای گره لفی ۲ و ۳/۵ میکرولیتر بود تمام مراحل ذکر شده انجام گردید. سایر عوامل مورد بررسی شامل مدت زمان مرحله گسترش (Extension) (نهایی)، رقیق کردن نمونه DNA با آب مقطر، رقیق کردن محصولات PCR به میزان  $10^{-3}$  و  $10^{-7}$  مرتبه و انجام مجدد PCR روی آنها و نیز تغییر غلظت اتیدیوم بروماید (Etidium Bromide) در ژل بود.

**۴- انجام آزمون:** پس از راه اندازی روش و تعیین تکرارپذیری آن روی بافت‌های مختلف برای تعیین میزان شیوع HTLV-1 در بافت‌های پارافینی گره لفی تعداد ۵۰ نمونه با روش تصادفی از بین نمونه‌های بافتی پارافینی بایگانی شده در بخش آسیب شناسی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد که در طول ۳۰ سال گذشته به دلایل مختلف از بدن بیماران جدا و نمونه برداری شده بودند انتخاب شده و سپس PCR با پرایمرهای Tax, Pol<sup>env</sup> و LTR روی آنها انجام شد.

**۲- جداسازی DNA:** در مرحله بعد بافت‌های پارافینه اعضای مختلف شامل: کبد، طحال، پوست و گره‌های لفی از بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان امام رضا(ع) مشهد که به دلایل مختلف از بیماران نمونه برداری شده بودند هر کدام یک بلوک به روش نمونه برداری طبقاتی انتخاب شده، با استفاده از میکروتوم برشهای ۱۰-۵ میکرونی تهیه شد. سپس با روش انکوپاسیون با پروتیناز K (شرکت سیگما، سنت لوئیس، آمریکا) DNA بافت استخراج گردید. این روش شامل ۲ بخش اصلی پارافین زدایی و پروتئین زدایی می‌باشد. جهت پروتئین زدایی از آنزیم پروتیناز K با غلظت ۲۰۰ mg/ml در بافر هضم کننده (Digestion Buffer) (شرکت سیناژن) استفاده شد. سپس با استفاده از اندازه گیری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر و محاسبه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ میزان خلوص DNA مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های با خلوص مناسب (نسبت برابر با تیتر ۲-۱/۵) جهت PCR انتخاب شدند.

**۳- نرمال کردن آزمون:** در ابتدا برای راه اندازی و بهینه سازی روش از پرایمرهای بتا اکتین (BA-1, BA-2) (MgCl<sub>2</sub>) وجود دارد استفاده شد. مقادیر متفاوتی کلرید منیزیم (dNTP) (شرکت سیناژن) و پرایمر با میزان ثابت DNA برای تمام نمونه‌ها به کار گیری شد. سپس بر روی نمونه‌ها PCR انجام شد.

در مرحله بعد برای بهینه سازی مقدار DNA، مقادیر تمام موارد را

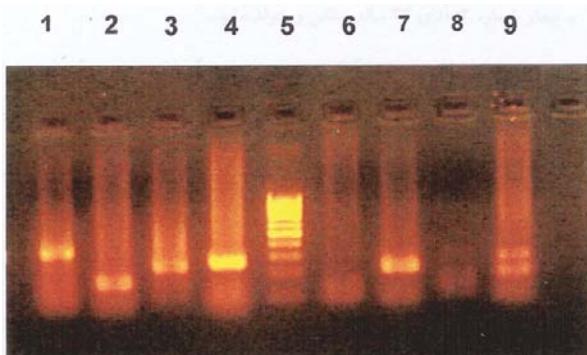
جدول (۲): بهینه سازی غلظت کلرید منیزیم و پرایمر در واکنش زنجیرهای پلیمراز روی بافت‌های پارافینی

مواد مورد استفاده	لوله آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
پرایمر بتا اکتین ۱	*	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۳	.۰۴	.۰۵	.۰۶		
پرایمر بتا اکتین ۲	*	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۳	.۰۴	.۰۵	.۰۶		
بافر	۱x	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵		
dNTP	۲۰۰	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵	.۰۵		
کلرید منیزیم (MgCl <sub>2</sub> )	میکرومول	۱/۵	۱/۵	۱	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵		
Taq	*	.۰۲	.۰۲	.۰۲	.۰۲	.۰۲	.۰۲	.۰۲	.۰۲		
الگو (Template)	۱ واحد(unit)	-	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵		
آب مقطر	-	۱۹/۳	۱۴/۵	۱۴/۸	۱۴/۵۵	۱۴/۷	۱۴/۵	۱۴/۳	۱۴/۱		
حجم نهایی (میکرولیتر)		۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵		

۲۰-۲۹ سالگی بود. شایع ترین محل نمونه برداری از گره‌های لفی گردند و دیگر نمونه‌ها از گره‌های لفی سایر نقاط مختلف بدن بودند. از نظر آسیب شناسی شایع ترین تشخیص لنفاویتی واکنشی

در بین ۵۰ نمونه گره لفی مورد بررسی ۴۴٪ مربوط به مردان و ۵۶٪ مربوط به زنان بودند. شایع ترین گروه سنی ۳۰-۳۹ سالگی و سپس

## نتایج



شکل(۱) DNA: استخراج شده از بلوک پارافینی گره لنفاوی. تکثیر قطعات tax,pol,env از ژنوم ویروس

۱: PCR با پرایمرهای (367 bp)HT-4,HT-1

۲: PCR با پرایمرهای (158 bp)HT-2,HT-1

۳: PCR با پرایمرهای (250 bp)HP-4,HP-1

۴: PCR با پرایمرهای مربوط به قطعه env (270bp)

۵: MWM(100BP)

۶: کنترل منفی بتا اکتین (H2O)

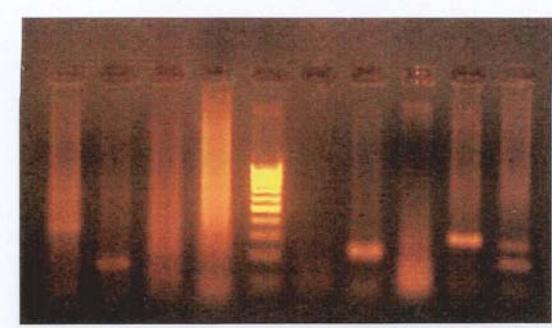
۷: کنترل مثبت بتا اکتین (200BP)

۸: کنترل منفی: DNA فرد سالم seronegative

۹: کنترل مثبت: DNA از نمونه خون فرد مبتلا به ATLL با پرایمرهای مربوط به قطعات tax, pol

در یک یمار دیگر مربوط به مرد ۳۳ ساله ای از گره لنفی گردن با تشخیص بافت شناسی لنفوم منتشر غیر هوچکینی با سلولهای کوچک شکافدار با دو پرایمر مربوط به قطعه tax نتیجه مثبت بود. اما با احتساب یک مورد R و LTR باند تشکیل نشد (تصویر ۲). لذا با احتساب یک مورد مثبت قطعی درصد شیوع ۲ درصد ذکر گردید. در صورت محاسبه مورد دوم نیز به عنوان مثبت، درصد شیوع ۴ درصد خواهد بود. اما این امر مستلزم تعیین توالی ژنوم ویروس جهت کسب نتیجه قطعی می باشد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



شکل(۲) : DNA: استخراج شده از بلوک پارافینی گره لنفاوی . PCR با پرایمر های مربوط به قطعات tax,pol,env از ژنوم ویروس

غیراختصاصی (۴۰٪) بود(جدول ۳) با استفاده از آزمون کای دو (X2) در بین دو جنس از نظر تشخیص آسیب شناسی تفاوت معنی دار وجود نداشت(p=0.171).

اما در بین گروه های سنی مختلف تفاوت معنی دار از نظر تشخیص آسیب شناسی دیده شد (p=0.002). به طوری که در رده سنی زیر ۱۰ سال تمامی نمونه ها با تشخیص لنفادنیت واکنشی غیراختصاصی بود. نتیجه آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین سن در تشخیص های آسیب شناسی مختلف تفاوت معنی دار دارد.

نسبت جذب DNA استخراج شده (جذب در ۲۶۰ نانومتر به جذب در ۲۸۰ نانومتر) برای اغلب نمونه ها ۱/۵-۲ و برای برخی ۵-۱/۵ بود. غلظت DNA استخراج شده از یک مقطع بافت ۱۰-۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود.

جدول (۳): توزیع فراوانی تشخیص نهایی آسیب شناسی در ۵۰ بلوک پارافینی گره لنفی

تشخیص	تعداد	درصد
واکنشی	۲۰	۴۰
آماسی	۱۲	۲۴
هوچکین	۴	۸
غیر هوچکین	۶	۱۲
متاستاز	۸	۱۶
تعداد کل	۵۰	۱۰۰

در اولین آزمایشات روی DNA بافتی با استفاده از پرایمر بتا اکتین بهترین غلظت کلرید منیزیم (MgCl2) ۲ میلی مول (۱ میکرولیتر) و بهترین غلظت پرایمر ۸ پیکومول (۰/۴ میکرولیتر) بود. مقدار مناسب DNA با پرایمرهای بتا اکتین برای طحال ۱ میکرولیتر، گره لنفی ۱/۵ میکرولیتر و پوست ۲/۵ میکرولیتر به دست آمد.

تعداد سیکل ها در آزمایشات اول ۵۰ که با کاهش به ۴۵ سیکل رسید که این کاهش زمان نتایج را رضایت بخش نمود و برخی نمونه ها که اسپر کمی داشتند باندهای واضح تری ایجاد کردند. اما کاهش تعداد به ۴۰ سیکل با نتایج منفی کاذب در تعدادی از نمونه ها همراه شد.

در بررسی بافت های گره لنفی یک مورد مربوط به خانم ۴۳ ساله با تشخیص لنفوم منتشر غیر هوچکینی با سلول درشت بود که با پنج سری پرایمر (دو قطعه برای tax, یک قطعه برای pol, LTR, env) در نواحی مربوط به هر کدام ایجاد باند نمود (تصویر ۱).

در لنفوسيت T دیده شده است. ژنوم HTLV-1 حاوی سه ناحیه رمزکننده env و Pol و gag و یک ناحیه با چارچوب بازخواندن ORF (Open Reading Frame) است. نواحی ۳ و ۴ ORF ژنهای تنظیمی Tax و Rex را رمز می کنند.<sup>(۱۳)</sup>

انکوپروتئین ۱-Tax بروز ژن های ویروس و نیز ژن های سلولی را تغییر داده و به تغییر شکل سلول T منتهی می شود. پروتئین های غشایی گروه G در تنظیم بیشتر عملکردهای سرولوژیک نقش دارند. ۱-Tax با واحد بتاپروتئین G واکنش نموده و جایگزینی ساب سلولار آن را به هم می زند.<sup>(۱۴)</sup> علاوه بر این در چندین گزارش نشان داده شده که ۱-Tax به طور مستقیم مسئول ناهنجاریهای ساتنروزومی مشاهده شده در ATL می باشد.<sup>(۱۵)</sup>

مطالعات اپیدمیولوژی ثابت کرده اند که راه اصلی انتقال در نواحی اندمیک به صورت عمودی (Vertical) از مادر به فرزند، با تغذیه از شیرمادر و نیز از طریق تماس جنسی از مرد به زن (با شیوع کمتر از زن به مرد) است.

روش های تشخیصی آزمایشگاهی متعددی برای این ویروس وجود دارد. از جمله روشن های سرولوژیک شامل آنزیم ایمونوناوسی (EIA)، پارتیکل اگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس (IFA) که روشهای اولیه جهت شناسایی هستند. آزمایش های تأییدی شامل وسترن بلات و RIPA (Radio Immuno Precipitation) می باشند.<sup>(۱۶)</sup>

از دیگر روشهای شناسایی ردبایی اسیدنوکلئیک ویروس با استفاده از هیبریداسیون ساترن بلات و هیبریداسیون درجا و PCR است. PCR از این بین، جهت تشخیص قطعی جایگاه ویژه ای دارد.<sup>(۱۷)</sup> اولین بار در سال ۱۹۸۳ Kery mullis ایده واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) را ارایه نمود. اولین مقاله مربوط به PCR در سال ۱۹۸۵ چاپ شد. از امتیازات این روش سرعت، حساسیت، عملکرد انتخابی، صحت و تکرار پذیری آن است.<sup>(۱۸)</sup> روش PCR در حال حاضر یکی از روش های مهم برای تشخیص سرطان یا جهش های نادر ژنی می باشد.<sup>(۱۹)</sup> برای بسیاری از عفونتها ویروسی نظری هپاتیت B، ایدز و یا آلوودگی به HTLV-1 به عنوان روشی تأیید کننده در کنار آزمایش های سرولوژی مطرح است.<sup>(۲۰)</sup>

با روش PCR می توان DNA نمونه های بافتی با ۴۰ سال قدمت را

۱: PCR با پرایمرهای ۱-HT-4,HT-1 (367 bp)

۲: PCR با پرایمرهای ۲-HT-2,HT-1 (158 bp)

۳: PCR با پرایمرهای ۳-HP-4,HP-1 (250 bp)

۴: PCR با پرایمرهای مربوط به قطعه env (270bp)

۵: MWM(100BP) ladder

۶: کنترل منفی بتا اکتین (H2O)

۷: کنترل مثبت بتا اکتین (200BP)

۸: کنترل منفی: فرد سالم seronegative DNA

۹: کنترل مثبت: DNA از نمونه خون فرد مبتلا به ATLL با پرایمرهای مربوط به قطعه pol

۱۰: کنترل مثبت: DNA از نمونه خون فرد مبتلا به ATLL با پرایمرهای مربوط به قطعات (multiplex) tax, pol

میزان شیوع HTLV-1 در بافت های پارافینه گره لنفی با توجه به مثبت شدن یک مورد قطعی در بین ۵۰ نمونه ۲ درصد بود که با آمار ارایه شده از شیوع آن درخون به روش ارزیابی سرولوژیک ۲/۳ درصد تفاوت معنی داری نداشت (p=0.883).

در بین گره های لنفی مبتلا به لنفوم غیرهوجکینی میزان موارد HTLV-1 مثبت ۷/۱۶ بود. (از بین ۶ بیمار با لنفوم غیرهوجکینی یک مورد آلوودگی به HTLV-1 وجود داشت).

## بحث

ویروس ۱ HTLV-1 اولین رتروویروس جداد شده از انسان است. ارتباط این ویروس با تعدادی از بیماریها از قبیل لوسمی و لنفوم سلول T بالغین (ATLL) و میلوپاتی پاراپارزی اسپاستیک (HAM/TSP) مشخص شده است.<sup>(۱)</sup> سایر بد خیمی های خونی به غیر از ATLL نیز در همراهی با عفونت HTLV-1 گزارش شده اند. ارتباط عفونت با طیف وسیعی از اختلالات چشمی شامل تومورهای آن، واسکولیت و نکروز شبکیه<sup>(۲,۳)</sup>، لنفوم سلول T ملتجمه<sup>(۴)</sup> و نیز با سندرم سیکا، گزروزیس، ایکتیوز<sup>(۴)</sup>، گاماپاتی منوکلونال و هیپر گاما گلوبولینی ذکر شده است.<sup>(۵)</sup>

مواردی از آرتروپاتی التهابی مزمن ویووئیت در تعداد کمی از افراد آلووده دیده شده است.<sup>(۱۱,۱۲)</sup>

این ویروس سلوهای مختلفی را آلووده می کند. گرچه لنفوسيت های B ممکن است آلووده شوند اما تبدیل توموری تنها

جوشاندن ساده بافت یا نمونه های سیتولوژی در آب مقطر استخراج نمود. امتیاز مهم این روش سرعت آن است. اما این روش در مواردی که تعداد توالی‌ها کم باشد (مثل عفونت‌های ویروسی) مناسب نیست. در این موارد روش بهتر استفاده از پروتئیناز K می‌باشد. افزایش طول مدت انکوباسیون با آنزیم از ۲۴ ساعت به ۵ روز قادر است تا ده برابر میزان DNA استخراج شده را افزایش دهد. ثابت شده است که پارافین زدایی از بافت تأثیر زیادی روی DNA ندارد. DNA استخراج شده در این روش اغلب غلطت بالایی داشته و دارای عواملی است که تضعیف کننده PCR هستند، لذا بهتر است قبل از PCR نمونه رقیق شود.

ضعیف بودن یا عدم وجود محصولات PCR ممکن است در نتیجه ممانعت از عملکرد آنزیم DNA پلی مراز به واسطه آلودگی DNA پلی مراز نمونه باشد. در این حالت اولین قدم رقیق کردن نمونه جهت کاهش عوامل آلوده کننده است. در مرحله بعد می‌توان DNA را توسط کیت‌های تجاری یا با استفاده از فنل - کلروفرم و رسوب با اتانول خالص کرد. اصلاحات بعدی می‌تواند افزایش غلظت آنزیم یا تغییر غلظت یون Mg در بافر PCR باشد در این پژوهش نیز در اغلب نمونه‌ها افزایش محدود در مقدار DNA موجب پاسخ منفی کاذب شد.

در PCR روی نمونه‌های پارافینی لازم است که برای هر نمونه از چندین غلظت DNA استفاده شود تا احتمال پاسخ‌های منفی کاذب کاهش یابد. در برخی از نمونه‌ها مشکل ایجاد شده تشکیل باندهای غیر اختصاصی یا اسمیر بود عوامل مختلفی از قبیل زیاد بودن زمان گسترش (Extension) (نهایی)، تعداد سیکل‌ها، غلظت پرایمر و MgCl<sub>2</sub> سبب این مشکل می‌شود. مقدار زیاد اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز سبب تشکیل اسمیر می‌شود. بالا بردن غلظت +Mg<sup>2+</sup> باعث ایجاد اسمیر و نیز ضعیف شدن باندهای حاصل از تکثیر DNA می‌گردد. نقش این یون در جداشدن دو زنجیره الگو از یکدیگر، اتصال پرایمر، اختصاصیت محصول، فعالیت و صحت عملکرد آنزیم می‌باشد.

غلظت بالای پرایمر نیز با اتصالات غیراختصاصی سبب ایجاد دایمر و محصولات غیراختصاصی می‌شود. از طرفی کم بودن پرایمر نیز وضوح بانده را کاهش می‌دهد. در پژوهش ما افزایش محدود

نیز تکثیر نمود، چرا که این روش در مورد DNA تخریب شده با وزن ملکولی پایین نیز کاربرد دارد. اولین بار در سال ۱۹۸۸ آقای Shibata (Shibata) یک روش ساده برای آماده سازی مقاطع بافت جهت PCR ارایه نمود. در این روش پس از پارافین زدایی بافت توسط جوشاندن، آن استخراج می‌شد. اما تنها قادر به تولید محصولات ۱۰۰ bp بود. در سال ۱۹۸۹ مانکس Mancs با ارایه روش آنزیم و پروتئیناز K توانست طول قطعات تکثیر شده را تا ۸۰۰ bp افزایش دهد.<sup>(۱۸)</sup>

گرچه روش PCR امتیاز بالقوه بررسی گذشته نگر روی بافت‌های فیکس شده را دارد، چندین گزارش نشان داده اند که PCR روی چنین نمونه‌هایی قابل اعتماد نبوده و میزان شکست آن را بین ۲۱ تا ۳۱٪ ذکر کرده اند. برخی عوامل شامل شرایط فیکساسیون و تعدادی از مهارکننده‌ها بر نتایج روش اثر گذار هستند.<sup>(۱۹)</sup> مهارکننده هادر اثر تداخل با واکنش می‌توانند موجب عدم آپلیفیکاسیون گردند. از جمله روش‌هایی که برای حذف این عوامل پیشنهاد شده، هضم به کمک پروتئیناز K و سپس تخلیص با فنل - کلروفرم و ساتریفوژ از طریق غشاها و ویژه می‌باشد. از سایر فاکتورهای مؤثر طول و غلظت توالی DNA و زمان فیکساسیون است.<sup>(۵)</sup>

در مرحله استخراج DNA تهیه مقاطع از قالب پارافینی اهمیت زیادی دارد. بافت‌های کبد و طحال نسبت به گره لنفی و پوست تراکم سلولی بیشتری دارند. بنابراین ضخامت برش آنها باید کمتر باشد. در صورت مناسب نبودن ضخامت مقاطع بافتی ممکن است در انجام PCR تداخل ایجاد شود. در صورت کم بودن ضخامت برش، غلظت DNA پائین و در صورت افزایش ضخامت آن پروتئین زدایی ناکامل بوده و ناخالصی افزایش می‌یابد.

برای نگهداری DNA استخراج شده اغلب بافر تریس-Tris (Tris) EDTA پیشنهاد می‌شود. اما EDTA موجود در این بافر یون می‌نیزیم (Mg<sup>2+</sup>) را که برای PCR اهمیت قابل توجهی دارد خارج می‌کند، لذا بهتر است از آب مقطر جهت نگهداری استفاده شود. در مورد بافت‌های تازه می‌توان زمان انکوباسیون با پروتئیناز K را به یک ساعت کاهش داد و DNA با کیفیت خوب و وزن ملکولی بالا به دست آورد. DNA مناسب برای PCR را می‌توان از طریق

متلا به ATLL دارای بافت آلدود به ویروس بودند. در یک مورد با وجود مثبت بودن سرمی، قطعات Pol و Tax در بافت قابل ردیابی نبود. به نظر مؤلف این امر احتمالاً به علت کیفیت نامناسب ثبت بافتی (Fixation) بوده است<sup>(۲۵)</sup>.

در مطالعه ای دیگر توسط کلارک در جاماییکاروی ۲۶ بیمار متلا به لنفوم غیرهوجکینی ۱۵ بیمار به ویروس HTLV-1 آلدود بودند و باقی HTLV-1 موارد از نظر پروویروس و آنتی بادی های ضد ویروس منفی گزارش شدند<sup>(۲۶)</sup>.

استفاده از روش PCR برای بررسی بافت های پارافینه امکانات وسیعی را در زمینه فعالیت های تحقیقاتی و تشخیص بیماریهای عفونی و بدخیمی فراهم می سازد. به عنوان نمونه در یکی از بیماران مورد مطالعه ما نمونه بافتی گره لنفی وی در ده سال قبل به عنوان گره لنفی واکنشی غیراختصاصی تشخیص داده شده بود که مدتی پس از آن به دلیل ضایعات پوستی بیمار مورد نمونه برداری پوستی قرار گرفته بود که تشخیص آسیب شناسی آن لنفوماتوئید پاپولوزیس (نوعی لنفوم پوستی از نوع سلول T) مطرح گردیده بود. انجام PCR روی بافت های پارافینه با پرایمراهای Pol, Tax حاکی از وجود ویروس HTLV-1 بود. بررسی گره لنفی پارافینه با روش PCR با پرایمراهای Pol, Tax و env نشان دهنده آلدودگی بافت به ویروس HTLV-1 بود.

### نتیجه گیری

راه اندازی این روش می تواند در بررسی بافت های پارافینه بیماران متلا به انواع بدخیمی ها و ارتباط آن با آلدودگی به HTLV-1 مژ باشد. همچنین این روش امکان بررسی موارد آلدودگی در بافت های قدیمی موجود در بایگانی بخش های آسیب شناسی و بررسی اپیدیولوژی و تاریخچه این آلدودگی را امکان پذیر می سازد.

### References

- Ackerman H, Berthiaume L, Tremblay M. Retroviridae in: *VIRal pathogenesis in diagrams*. CRS press Co, 2001: 165-195
- Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, Ahkami R Franchini G. *Prevalence of*

دمای اتصال (Annealing)، کاهش تعداد سیکل، زمان گسترش (Extension) نهایی و غلظت اتیدیوم بروماید ژل در از بین بردن اسمیر و باندهای غیراختصاصی مؤثر بود.

در مقایسه باندهای حاصل از پرایمراهای بتاکتین، Tax و Pol مشخص شد که بتاکتین به دلیل وجود آن در همه سلولها باند قوی تری ایجاد می کند. Tax نیز از Pol قوی تر است که احتمالاً به دلیل وجود برخی نمونه های ناقص ویروس (Defective provirus) که در قطعه Pol دچار حذف شده اند، می باشد<sup>(۲۰)</sup>. در این پژوهش نیز در یکی از بافت های پارافینه گره لنفی قطعه Tax قابل ردیابی بود. اما قطعه Pol, env و LTR در شرایط مختلف تکثیر نشدند.

کروبر (Krober) و همکارانش وجود پروویروس های ناقص را در سلولهای توموری متلایان به ATLL نشان دادند<sup>(۲۱)</sup>.

در مطالعه ای دیگر که توسط Kira انجام شد با استفاده از پرایمراهای Pol, Tax و env به دفعات پروویروس های ناقص از نمونه های اعصاب مرکزی بیماران متلا به HAM/TSP ردیابی شد<sup>(۲۲)</sup>.

Env و همکارانش نیز با استفاده از پرایمراهای Pol و Ohara نتوانستند در CNS بیماران متلا به HAM/TSP ویروس را ردیابی کنند<sup>(۲۳)</sup>.

فرضیه دیگر قابل طرح برای این بیمار وجود توالی های رتروویروس داخلی (Endogenous retroviral sequence) که جزو ژنوم سلولی هستند می باشد. این توالی با توالی های ژنوم رتروویروس از جمله Tax مشابه داشته، در شرایط خاص فعال شده و سبب مثبت شدن آزمایش می شود. تعیین وضعیت قطعی در این شرایط به استفاده از پرایمراهای دیگر و آزمایشات سرولوژیک HTLV-1 و تعیین توالی (Sequencing) ژنوم وابسته است<sup>(۲۴)</sup>.

در یک مطالعه توسط ستوياما (Setoyama M.) با روش PCR- ISH بر روی بافت های پارافینه ۹۰٪ مورد از ۱۰ بیمار بیماران

*HTLV-1 type 1 infection in iran : a serological and genetic study.* Aids Res Hum Retroviruses 1996; 12, 1185-90.

3- Perandin F, Cariani A, Bonfanti C, Trainini L, Magoni M, Manca N. *Human T-cell lymphotropic*

- virus type I (HTLV-I) confirmed by PCR-Southern blot and sequencing analysis in a woman with tropical spastic paraparesis.* Neurol Sci. 2006 Sep; 27(4):257-60.
- 4- Yanagihara R. *Geographic-Specific genotypes or topotypes of HTLV-1 as markers for early and recent migrations of human populations.* Adv virus 1994 : Res 43, 147-86.
- 5- An SF, Fleming KA. *Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues.* J Clin Pathol. 1991: Nov;44(11):924-7.
- 6- Merle H, Donnio A, Gonin C, Jean-Charles A, Panelatti G, Plumelle Y. *Retinal vasculitis caused by adult T-cell leukemia/lymphoma.* Jpn J Ophthalmol. 2005 Jan-Feb;49(1):41-5.
- 7- Levy-Clarke GA, Buggage RR, Shen D, Vaughn LO, Chan CC, Davis JL. *Human T cell lymphotrophic virus type-I associated T-cell leukemia/lymphoma a masquerading as necrotizing retinal vasculitis.* Ophthalmology. 2002 Sep; 109(9): 1717-22.
- 8- Buggage RR, Smith JA, Shen D, Chan CC. *Conjunctival T cell lymphoma caused by human T-cell lymphotrophic virus infection.* Am J Ophthalmol. 2001 Mar; 131(3): 381-3.
- 9- Nobre V, Guedes AC, Martins ML, Barbosa-Stancioli EF, Serufo JC, Proietti FA, Ribas JG, Ferreira CE, Lambertucci JR. *GIPH Interdisciplinary Group on HTLV-1/2 Research. Dermatological findings in 3 generations of a family with a high prevalence of human T cell lymphotrophic virus type 1 infection in Brazil.* Clin Infect Dis. 2006: Nov;43(10):1257-63.
- 10- Patronas M, Smith JA, Levy-Clarke GA, Reed GF. Buggage RR. *Hypergammaglobulinemia and corneal opacities in patients with human T-cell*
- lymphotrophic virus type-1.* Am J Ophthalmol. 2006 Dec;142(6),1088-9.
- 11- Mochizuki M, Ono A, Ikeda E. *HTLV-1 uveitis.* J AIDS Hum Retroviruses. 1996; 13(supp 1):50-56.
- 12- Cruz BA,Catalan-soares B,Proietti F. *Higher prevalence of fibromyalgia in patients infected with human T cell lymphotropic virus type I.* J Rheumatol. 2006 Nov: 33(11),2300-3.
- 13- Green P, Chen I. *Human T cell leukemia virus types 1 and 2 in:* Knipe D, Howley P, Fields Virology, 4th ed, Lippincott Co, 2001: 1941-70.
- 14- Twizere JC, Springael JY, Boxus M, Burny A, Dequiedt F, Dewulf JF & et al. *Human T-cell leukemia virus type-I Tax oncoprotein regulates G-protein signaling.* Blood. 2007 Feb 1:109(3),1051-60. Epub 2006 Sep 21.
- 15- Pumfrey A, de la Fuente C, Kashanchi F. *HTLV-1 Tax: Centrosome amplification and cancer.* Retrovirology. 2006 Aug 9:3,50.
- 16- Bergmen J. Biotechniques 1999: 26, 528-530.
- 17- Selva Kumar N. Biotechniques 1997: 22, 604-606.
- 18- Higuchi R, Von Beroldingen C. Nature 1988: 332, 843.
- 19- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. *Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction.* J Histochem Cytochem. 1991 Mar; 39(3):351-4.
- 20- Sueyoshi K, Goto M, Johnosono M, Sato E, Shibata D. *Anatomical distribution of HTLV-1 proviral sequence in an autopsy case of HTLV-1 associated myopathy: a polymerase chain reaction study.* Pathol Int. 1994 Jan: 44(1):27-33.
- 21- Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M. *Polymerase chain reaction analysis of*

- defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia.** J Virol. 1991 Oct; 65(10):5471-6.
- 22- Kira J, Itoyama Y, Koyanagi Y, Tateishi J, Kishikawa M, Akizuki S & et al. **Presence of HTLV-I proviral DNA in central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy.** Ann Neurol. 1992 Jan; 31(1):39-45.
- 23- Ohara Y, iwasaki Y, Isumo S, Kobayashi I, Yoshioka. **Search for HTLV-1 Proviral sequences by PCR in the CNS tissue of HAM.** Arch virol 124 : 31-43, 1992.
- 24- Wilkenson DA, Mager D, Leong TA. **Endogenous Human retroviruses In : Levy JA.** The retroviridae. new york: Plenum press, 1994: 465-536.
- 25- Setoyama M, Kerdel FA, Elgart G, Kanzaki T, Byrnes JJ. **Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma.** Am J Pathol. 1998 Mar; 152(3):683-9.
- 26- Clark JW, Gurgo C, Franchini G, Gibbs WN, Lofters W, Neuland C& et al. **Molecular epidemiology of HTLV-I-associated non-Hodgkin's lymphomas in Jamaica.** Cancer. 1988 Apr; 1;61(7):1477-82.