

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

دکتر محمود محمودی^۱، دکتر علیرضا خویی^۲، دکتر مهدی فرزادینیا^{۳*}، مریم راستین^۴

چکیده

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

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی به صورت آزمایشگاهی به منظور تثبیت تکنیک است. ابتدا جستجوی ژن تاکتین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوطه بر روی نمونه های 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 بلوک های بافتی مختلف، متفاوت بود. پس از آن PCR با پرایمرهای tax، env، pol و 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 آلوده به HTLV-1 نشان داده شد. **نتایج:** بین ۵۰ مورد بافتهای مربوط به گره های لنفی در یک مورد بیمار مبتلا به لنفوم غیرهوجکینی 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 غیرهوجکینی تنها با دوسری پرایمر Tax مثبت بوده و با سایر پرایمرها باندی ایجاد نکرد. با احتساب مورد اول (به سبب قطعیت آلودگی به HTLV-1) درصد شیوع در بافت های پارافینه گره های لنفی ۲ درصد می باشد. در صورت محاسبه مورد دوم شیوع آلودگی به ۴ درصد افزایش می یابد. **نتیجه گیری:** مقایسه میزان آلودگی بافتی در این مطالعه با شیوع سرولوژیک نمونه های خون (۲/۳ درصد) مطالعه دیگر از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان نداد و نتایج یکدیگر را تأیید کردند (P=0.883).

واژه های کلیدی: واکنش زنجیره ای پلیمرز، ویروس HTLV-1، لنفوم، استخراج DNA

مقدمه

تاریخ حیات بشری و سیر تحول علم همگام با فعالیت ها و

۱- دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی

۲- دانشیار گروه آسیب شناسی

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

Email: mhdfarzadnia@yahoo.com

۴- دانشجوی دکتری ایمونولوژی - مرکز تحقیقات ایمونولوژی

۱، ۲، ۳، ۴- 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 بیماری ها و افزایش طول عمر داشته است. از جمله فعالیت هایی 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 آلودگی به ویروس ها نظیر HTLV-1 می تواند در طراحی

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

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

روشهای شناسایی ردیابی اسیدنوکلیتیک 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^(۳). 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 موتاسیون 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 توکسوپلازما و یا سایر عوامل عفونی نظیر هلیکوباکتر پیلوری نیز به خوبی باز نموده است^(۴). گر چه برخی ادعا نموده اند که انجام PCR بر روی چنین نمونه هایی

قابل اعتماد نبوده و میزان شکست آن را بین ۲ تا ۳۱٪ ذکر کرده اند^(۵). اما با توجه به اینکه نمونه های بافتی بیماران در بایگانی بخش های آسیب شناسی برای مدت طولانی (تا نیم 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 مرز (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 پیدایش آن رهگشا 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 شدند. برای اطمینان از نداشتن مشابهت بین توالی پرایمرها با سایر توالیهای ژنتیکی موجود از اطلاعات موجود در بانک ژنتیکی NCBI (National Center Biological Institute) و برنامه نرم افزاری بلاست (Blast) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل دو سری پرایمر برای قطعه tax به نام های [HT-2, HT-1] و [HT-1, HT-4] و یک سری برای pol (HP-1 و HP-4) LTR و env بودند (شرکت Roche) (جدول ۱). جهت تعیین صحت عملکرد پرایمرها از نمونه خون متعلق به یک فرد با تشخیص قطعی ATLL استفاده شد.

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

۲- جداسازی DNA: در مرحله بعد بافت‌های پارافینه اعضای مختلف شامل: کبد، طحال، پوست و گره‌های لنفی 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 انکوباسیون با پروتئیناز K (شرکت سیگما، سنت لوئیس، آمریکا) DNA بافت استخراج گردید. این روش شامل ۲ بخش اصلی پارافین زدایی و پروتئین زدایی می باشد. جهت پروتئین زدایی از آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۲۰۰mg/ml در بافر هضم کننده (Digestion Buffer) (شرکت سینازن) استفاده شد. سپس با استفاده از اندازه گیری جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر و محاسبه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ میزان خلوص DNA مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های با خلوص مناسب (نسبت برابر با تیر ۲-۱/۵) جهت PCR انتخاب شدند.

۳- نرمال کردن آزمون: در ابتدا برای راه اندازی و بهینه سازی روش از پرایمرهای بتا اکتینین (BA-1, BA-2) که در همه سلولها وجود دارد استفاده شد. مقادیر متفاوتی کلرید منیزیم (MgCl₂) (شرکت سینازن) و پرایمر با میزان ثابت DNA برای تمام نمونه ها به کارگیری شد. سپس بر روی نمونه ها PCR انجام شد.

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

ثابت 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 نمونه های بلوک پارافینی پوست و گره لنفی طراحی شدند. با استفاده از پرایمرهای Pol, Tax و با مقادیر متفاوت الگو (Template) که برای نمونه های پوست ۳/۵ و ۵ میکرولیتر و برای گره لنفی 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 ۱۰^۳ و ۱۰^۷ 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 لنفی تعداد ۵۰ نمونه با روش تصادفی از بین نمونه های بافتی پارافینه 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, env و LTR روی آنها انجام شد.

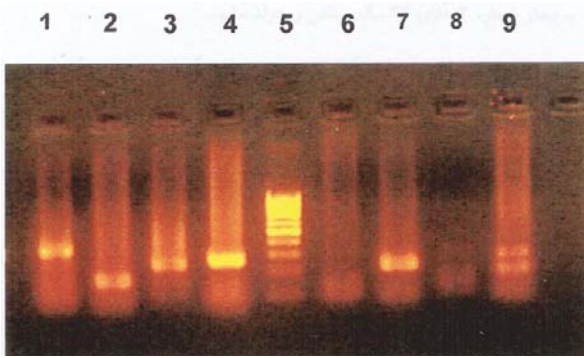
جدول (۲): بهینه سازی غلظت کلرید منیزیم و پرایمر در واکنش زنجیرهای پلیمرز روی بافت های پارافینی

لوله آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	غلظت نهایی	غلظت
مواد مورد استفاده									
پرایمر بتا اکتینین ۱	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۵	۰/۵	۰/۵	*	۰/۵
پرایمر بتا اکتینین ۲	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۵	۰/۵	۰/۵	*	۰/۵
بافر	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	1x	۲/۵
dNTP	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۲۰۰	۰/۵
کلرید منیزیم (MgCl ₂)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	میکرومول	۱/۵
Taq	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	*	۰/۲
الگو (Template)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۱ واحد (unit)	-
آب مقطر	۱۴/۱	۱۴/۳	۱۴/۵	۱۴/۷	۱۴/۵۵	۱۴/۸	۱۴/۵	-	۱۹/۳
حجم نهایی (میکرولیتر)	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	-	۲۵

نتایج

۲۹-۲۰ سالگی بود. شایع ترین محل نمونه برداری از گره های لنفی گردن و دیگر نمونه ها از گره های لنفی سایر نقاط مختلف بدن بودند. از نظر آسیب شناسی شایع ترین تشخیص لنفادنیت واکنشی

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



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

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

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

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

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

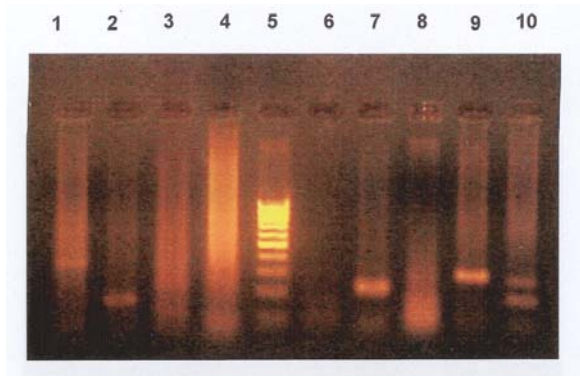
۵: MWM (100BP)

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, env (multiplex) در یک بیمار دیگر مربوط به مرد ۳۳ ساله ای از گره لنفی گردن با تشخیص بافت شناسی لنفوم منتشر غیر هوجکینی با سلولهای کوچک شکافدار با دو پرایمر مربوط به قطعه tax نتیجه مثبت بود. اما با پرایمرهای pol و env 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.



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 ۲-۱/۵ و برای برخی ۱-۱/۵ بود. غلظت DNA استخراج شده از یک مقطع بافت ۱۰-۵ میکرونی بین ۵۰۰-۱۰۰ 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
هوجکین	۴	۸
غیر هوجکین	۶	۱۲
مناساز	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 اسمیر 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 غیرهوجکینی با سلول درشت بود که با پنج سری پرایمر (دو قطعه برای tax، یک قطعه برای pol, env (LTR, env) در نواحی مربوط به هر کدام ایجاد باند نمود (تصویر ۱).

در لنفوسیت T دیده شده است. ژنوم HTLV-1 حاوی سه ناحیه رمزکننده gag، env، Pol 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^(۱۳).

انکوپروتئین Tax-1 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 بیولوژیک نقش دارند. Tax-1 با واحد بتا پروتئین G واکنش نموده و جایگزینی ساب سلولار آن را به هم می زند^(۱۴). علاوه بر این در چندین گزارش نشان داده شده که Tax-1 به طور مستقیم مسئول ناهنجاریهای سانتروزومی مشاهده شده در ATL می باشد^(۱۵).

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 روش های سرولوژیک شامل آنزیم ایمنونواسی (EIA)، پارتیکل آگلوتیناسیون و ایمنوفلورسانس (Immunofluorescence assay) (IFA) که روشهای اولیه جهت شناسایی هستند. آزمایش های تأییدی شامل وسترن بلات و RIPA (Radio Immuno Percipitation) می باشند^(۱۳).

از دیگر 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^(۳).

اولین بار در سال ۱۹۸۳ Kery mullis ایده واکنش زنجیره ای پلی مرارز (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^(۳). روش PCR در حال حاضر یکی از روش های مهم برای تشخیص سرطان یا جهش های نادر ژنی می باشد^(۱۶). برای بسیاری از عفونتهای ویروسی نظیر هپاتیت B، ایدز و یا آلودگی به HTLV-1 به عنوان روشی تأیید کننده در کنار آزمایشهای سرولوژی مطرح است^(۱۷).

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

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

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

۳: PCR با پرایمرهای 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: DNA فرد سالم seronegative

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 tax, pol (multiplex)

میزان شیوع HTLV-1 در بافتهای 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 ۱۶/۷٪ بود. (از بین ۶ بیمار با لنفوم غیرهوجکینی یک مورد آلودگی به HTLV-1 وجود داشت).

بحث

ویروس HTLV-1 اولین رتروویروس جدا شده از انسان است. ارتباط این ویروس با تعدادی از بیماریها از قبیل لوسمی و لنفوم سلول T بالغین (ATLL) و میلوپاتی پاراپارازی اسپاستیک (HAM/TSP) مشخص شده است^(۱). سایر بدخیمی 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^(۶،۷)، لنفوم سلول T ملتحمه^(۸) و نیز با سندرم سیکا، گزروزیس، ایکتیوز^(۹)، گاماپاتی منوکلونال و هیبرگاماگلوبولینمی ذکر شده است^(۱۰).

مواردی از آرتروپاتی التهابی مزمن ویوئیت در تعداد کمی از افراد آلوده دیده شده است^(۱۱،۱۲).

این ویروس سلوهای مختلفی را آلوده می کند. گرچه لنفوسیت های B ممکن است آلوده 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 توالی ها کم باشد (مثل عفونت های ویروسی) مناسب نیست. در این موارد روش بهتر استفاده از پروتئیناز K می باشد.

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 غلظت 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 مرز به واسطه آلودگی DNA پلی مرز نمونه باشد. در این حالت اولین قدم رقیق کردن نمونه جهت کاهش عوامل آلوده کننده است. در مرحله بعد می توان DNA را توسط کیت های تجارتي یا با استفاده از فنل - کلروفرم و رسوب با اتانول خالص کرد. اصلاحات بعدی می تواند افزایش غلظت آنزیم یا تغییر غلظت یون Mg در بافر PCR باشد در این پژوهش نیز در اغلب نمونه ها افزایش محدود در مقدار DNA موجب پاسخ منفی کاذب شد.

در PCR روی نمونه های پارافینی لازم است که برای هر نمونه از چندین غلظت DNA استفاده شود تا احتمال پاسخ های منفی کاذب کاهش یابد. در برخی از نمونه ها مشکل ایجاد شده تشکیل باندهای غیر اختصاصی یا اسمیر بود عوامل مختلفی از قبیل زیاد بودن زمان گسترش (Extension) نهایی، تعداد سیکل ها، غلظت پرایمر و MgCl₂ سبب این مشکل می شود. مقدار زیاد اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورس سبب تشکیل اسمیر می شود. بالا بردن غلظت Mg²⁺ باعث ایجاد اسمیر و نیز ضعیف شدن باندهای حاصل از تکثیر DNA می گردد. نقش این یون در جداسدن دو زنجیره الگو از یکدیگر، اتصال پرایمر، اختصاصیت محصول، فعالیت و صحت عملکرد آنزیم می باشد.

غلظت بالای پرایمر نیز با اتصالات غیر اختصاصی سبب ایجاد دایمر و محصولات غیر اختصاصی می شود. از طرفی کم بودن پرایمر نیز وضوح باندها را کاهش می دهد. 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 شیباتا (Shibata) یک روش ساده برای آماده سازی مقاطع بافتی جهت PCR ارایه نمود. در این روش پس از پارافین زدایی بافت توسط جوشاندن DNA آن استخراج می شد. اما تنها قادر به تولید محصولات ۱۰۰bp بود. در سال ۱۹۸۹ مانکس Mancs با ارایه روش آنزیم و پروتئیناز K توانست طول قطعات تکثیر شده را تا ۸۰۰bp افزایش دهد.^(۱۸)

گرچه روش PCR امتیاز بالقوه بررسی گذشته نگر روی بافت های فیکس شده را دارد، چندین گزارش نشان داده اند که PCR روی چنین نمونه هایی قابل اعتماد نبوده و میزان شکست آن را بین ۳ تا ۳۱٪ ذکر کرده اند. برخی عوامل شامل شرایط فیکساسیون و تعدادی از مهارکننده ها بر نتایج روش اثر گذار هستند.^(۱۹) مهارکننده هادر اثر تداخل با واکنش می توانند موجب عدم آمپلیفیکاسیون گردند. از جمله روش هایی که برای حذف این عوامل پیشنهاد شده، هضم به کمک پروتئیناز K و سپس تخلیص با فنل - کلروفرم و سانتریفوژ از طریق غشاهای ویژه می باشد. از سایر فاکتورهای مؤثر طول و غلظت توالی DNA و زمان فیکساسیون است.^(۵)

در مرحله استخراج DNA تهیه مقطع از قالب پارافینی اهمیت زیادی دارد. بافت های کبد و طحال نسبت به گره لافی 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 می یابد.

برای نگهداری DNA استخراج شده اغلب بافر تریس-Tris (EDTA پیشنهاد می شود. اما EDTA موجود در این بافر یون منیزیم (Mg²⁺) را که برای PCR اهمیت قابل توجهی دارد خارج می کند، لذا بهتر است از آب مقطر جهت نگهداری استفاده شود. در مورد بافت های تازه می توان 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 می توان از طریق

مبتلا به ATLL دارای بافت آلوده 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 ثبوت بافتی (Fixation) بوده است^(۲۵).

در مطالعه ای دیگر توسط کلارک در جامائیکا روی ۲۶ بیمار مبتلا به لنفوم غیرهوجکینی ۱۵ بیمار به ویروس HTLV-1 آلوده بودند و باقی موارد از نظر پروویروس و آنتی بادی های ضد ویروس HTLV-1 منفی گزارش شدند^(۲۶).

استفاده از روش PCR برای بررسی بافت‌های 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 بافت‌های پارافینه با پرایمرهای Tax, Pol حاکی از وجود ویروس HTLV-1 بود. بررسی گره لنفی پارافینه با روش PCR با پرایمرهای Tax, Pol و env نشان دهنده آلودگی بافت به ویروس HTLV-1 بود.

نتیجه گیری

راه اندازی این روش می تواند در بررسی بافت‌های پارافینه بیماران مبتلا به انواع بدخیمی ها و ارتباط آن با آلودگی به HTLV-1 مثر باشد. همچنین این روش امکان بررسی موارد آلودگی در بافت‌های قدیمی موجود در بایگانی بخش های آسیب شناسی و بررسی اپیدمیولوژی و تاریخچه این آلودگی را امکان پذیر می سازد.

References

- 1- Ackerman H, Berthiaume L, Tremblay M. Retroviridae in: *VIRal pathogenesis in diagrams*. CRS press Co, 2001: 165-195
- 2- 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 پرایمرهای 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^(۲۰).

در این پژوهش نیز در یکی از بافت‌های پارافینه گره لنفی قطعه Tax قابل ردیابی بود. اما قطعه env, Pol و LTR در شرایط مختلف تکثیر نشدند.

کروبر (Krober) و همکارانش وجود پروویروس های ناقص را در سلولهای توموری مبتلایان به ATLL نشان دادند^(۲۱).

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

Ohara و همکارانش نیز با استفاده از پرایمرهای Pol و Env نتوانستند در CNS بیماران مبتلا به HAM/TSP ویروس را ردیابی کنند^(۲۳).

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 مشابهت داشته، در شرایط خاص فعال شده و سبب مثبت شدن آزمایش می شود. تعیین وضعیت قطعی در این شرایط به استفاده از پرایمرهای دیگر و آزمایشات سرولوژیک HTLV-1 و تعیین توالی (Sequencing) ژنوم وابسته است^(۲۴).

در یک مطالعه توسط ستویاما (Setoyama M.) با روش PCR-ISH بر روی بافت‌های پارافینه ۹۰٪ (۹ مورد از ۱۰ بیمار) بیماران

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

- virus type 1 (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 Res* 1994 : 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 lymphotropic virus type-1 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 lymphotropic 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 lymphotropic 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 lymphotropic 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-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling*. *Blood*. 2007 Feb 1:109(3),1051-60. Epub 2006 Sep 21.
- 15- Pumfery 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 myelopathy: 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-I 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.