Original Article

Detection of HCMV Infection in Glioma Brain Tumors

Mohammad Reza Jabbari[1], Farzaneh Sabahi[2*], Reza Shirkouhi[3], Behzad Khansarinejad[4], Houshang Saberi[5], Mohsen Karimi Arzanani[6]

1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Genetics, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
5- Assistant Professor, Department of Neurosurgery, Brain and Spinal Injury Repair Research Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: sabahi_f@modares.ac.ir

Received: 05/May/2013, Accepted: 25/Sep/2013

Abstract

Objective: Human cytomegalovirus (HCMV) is a beta-herpesvirus that causes persistent infection in humans, as well as severe disease in fetuses and immunocompromised individuals. Although HCMV is not currently causally implicated in human cancer, emerging evidence suggests that HCMV infection may be specifically associated with malignancies such as gliomas. Gliomas are one of the most common brain tumors that affect humans. It is classified into four grades. In this study, we have developed and used a real-time PCR method for the detection and diagnosis of HCMV infection in glioma brain tumor samples.

Methods: Paraffin-embedded tumor samples were chosen from patients who referred to Imam Khomeini Hospital Neurosurgery Ward. DNA was extracted from paraffin-embedded tissues by a DNA extraction kit. After designing specific primers for the HCMV US28 region, a real-time PCR method was developed for detection of HCMV US28.

Results: The results of qualitative real-time PCR on 4/18 patients (22.2%) were positive. Two patients with positive HCMV results died.

Conclusion: This is the first study that has monitored HCMV genes in samples from glioma patients in Iran. Considering the results of this study and controversies associated with other studies, a more comprehensive study using this and other diagnostic methods is suggested.

Keywords: Glioma, HCMV, PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 2, Summer 2013, Pages: 13-23

مقاله اصیل

شناسایی عفونت سایتومگالوویروس انسانی در تومورهای مغزی گلیوما

محمدرضا جباری[1]، فرزانه صباحی[2*]، رضا شیرکوهی[3]، بهزاد خوانساری نژاد[4]، هوشنگ صابری[5]، محسن کریمی ارزنانی[6]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر ایران، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۵- استادیار، گروه جراحی اعصاب، مرکز ترمیم ضایعات مغزی نخاعی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۶- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی
Email: sabahi_f@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۷/۰۳

چکیده

هدف: ویروس سایتومگال انسانی بتا هرپس ویروسی است که باعث عفونت پایدار در افراد شده و بیماری‌های شدیدی را در جنین و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌کند. اگر چه ویروس سایتومگال انسانی به عنوان یک ویروس عامل در سرطان‌های انسانی به حساب نمی‌آید اما مطالعات جدید نشان می‌دهد عفونت با ویروس سایتومگال انسانی ممکن است به‌طور اختصاصی باعث بعضی از سرطان‌های انسانی از جمله گلیوما باشد. گلیوما یکی از شایع‌ترین سرطان‌های مغزی است که در کودکان و بزرگسالان دیده می‌شود و دارای ٤ درجه است. در این پژوهش در راستای شناسایی و تشخیص عفونت با ویروس سایتومگال انسانی در نمونه‌های گلیومای مغزی، یک روش Real-Time PCR راه‌اندازی و استفاده شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های پارافینه تومور مغزی گلیوما از بیماران مراجعه کننده به بخش جراحی اعصاب بیمارستان امام خمینی انتخاب شد. با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت پارافینه جداسازی شد. پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه US28 ویروس سایتومگال انسانی اقدام به بهینه‌سازی و انجام واکنش Real-Time PCR شد.

نتایج: نتیجه Real-Time PCR کیفی روی ٤ بیمار از ۱۸ بیمار مثبت بود که حدود ۲۲/۲ درصد است. ۲ نفر از بیمارانی که ویروس سایتومگال انسانی آن‌ها مثبت شد، فوت کردند.

نتیجه‌گیری: این اولین مطالعه برای ردیابی وجود ژن سایتومگالوویروس انسانی در نمونه‌های بیماران مبتلا به گلیوما در ایران است. با توجه به یافته‌های این گزارش و گزارش‌های دیگران، مطالعات گسترده‌تری با استفاده از روش‌های تشخیصی دیگر پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژگان: گلیوما، سایتومگالوویروس انسانی، PCR

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحات: ۱۳-۲۳

مقدمه

سایتومگالوویروس‌های انسانی (Human Cytomegalovirus: HCMV) بتا هرپس ویروس‌هایی (Beta Herpes Viruses)

هستند که در همه جا پراکنده بوده و از عوامل شایع بیماری‌های انسانی محسوب شده و مانند تمام هرپس ویروس‌ها باعث ایجاد عفونت مخفی در تمام طول عمر فرد می‌شوند. این ویروس‌ها پس از عفونت اولیه در کلیه، مغز استخوان، گلبول‌های سفید و غدد بزاقی پنهان شده و به‌طور متناوب از گلو و ادرار دفع می‌شوند. HCMV شایع‌ترین و مهم‌ترین عامل ویروسی در بیماری‌های مادرزادی می‌باشند، آن‌ها همچنین مهم‌ترین بیماری‌زای (Pathogen) فرصت‌طلب ویروسی در افراد دچار نقص ایمنی و دریافت کنندگان پیوند هستند [۱]. با تحقیقات در سال‌های اخیر مشخص شده که ممکن است HCMV با بعضی از تومورها از جمله تومورهای دستگاه عصبی مرکزی نیز ارتباط داشته باشد [۲].

یکی از شایع‌ترین تومورهای مغزی گلیوما (Glioma Tumor) نام دارد که در نتیجه درگیری سلول‌های گلیال (Glial Cells) و بدخیمی این سلول‌ها در مغز به وجود می‌آید. گلیوما را براساس شدت بیماری به ٤ درجه (Grade) طبقه‌بندی کرده‌اند. درجه ۱ و ۲ نوع خفیف و درجه ۳ و ٤ نوع شدید و بدخیم بیماری است. این نوع از تومورها بدترین پیش‌آگهی را در بین سرطان‌های سیستم عصبی مرکزی دارد و با وجود تمام اقدامات درمانی شامل جراحی مغز و برداشتن تومور، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و استفاده از کورتیکواستروییدها (Corticosteroids) میانگین زنده ماندن بیمار در انواع شدید بیماری ١٤ ماه است [۳، ٤].

بیشتر موارد گلیوما به‌صورت تک‌گیر و بدون هیچ‌گونه استعداد ژنتیکی ظاهر می‌شود. ویروس‌ها ممکن است به‌عنوان قوی‌ترین عامل ایجاد کننده این بیماری مطرح باشند زیرا در تحقیقات انجام شده مشخص شده که عامل گلیوما ممکن است SV40 یا HCMV باشد [٥، ٦].

ارتباطی بین گلیوما با سیگار کشیدن، تغذیه و میدان‌های الکترومغناطیسی یافت نشده است [۷-۹]. همچنین به‌نظر می‌رسد ارتباط اندکی بین گلیوما و اشعه یونیزان وجود دارد [۱۰]. برخی نیز معتقدند احتمال دارد ارتباطی بین گلیوما و پلی‌وینیل کلراید (Polyvinyl Chloride) (که به‌طور متداول در صنعت ساخت و ساز به‌کار می‌رود) وجود داشته باشد [۱۱].

با پیشرفت علوم سلولی مولکولی و ابداع روش‌های جدید و انجام آزمایش‌های دقیق‌تر و تحقیقات بیشتر شک دانشمندان برای نقش داشتن HCMV در ایجاد گلیوما کمتر شده است.

واکنش متقابل این ویروس و سیستم ایمنی بدن که در نهایت باعث پیشبرد فرآیندهای مولکولی درون سلول به سمت تومور می‌شود از چند منظر قابل بررسی است. همان‌طور که می‌دانیم هرپس ویروس‌ها به سلول‌های بافت عصبی تمایل دارند و می‌توانند در محیط آزمایشگاه پیش‌سازهای بافت عصبی را آلوده کرده و روند تبدیل آن‌ها را به بافت نورون کامل تحت تأثیر قرار دهند [۱۲]. HCMV روند افتراق نورون‌ها و آستروسیت‌ها (Astrocyte) را تحت تأثیر قرار داده و شاید به همین علت نوزادان آلوده به این ویروس دچار عقب‌ماندگی ذهنی و نقایص عصبی می‌شوند که نمونه آن را در طول سال در سراسر دنیا مشاهده می‌کنیم. در این ویروس تمایل به مخفی شدن در سلول‌های کلیه وجود دارد؛ ثابت شده است در محیط آزمایشگاه در سلول‌های عصبی نیز مخفی شده و به حالت نهفته باقی می‌مانند. فعال شدن مجدد ممکن است در شرایطی مثل بارداری، استرس، پیری یا هر شرایطی که بدن فرد را از لحاظ ایمنی تحت تأثیر قرار می‌دهد، اتفاق بیفتد [۱۳]. سلول‌های پیش‌ساز عصبی به شدت به ورود این ویروس حساس هستند و HCMV به راحتی در آن‌ها وارد شده و رشد می‌کند [١٤]. پروتئین‌های IE-72 [Immediate- Early (IE) Proteins] و IE-86 که از ژن‌های بسیار زودرس HCMV تولید می‌شوند با پروتئین‌های P53 و Rb سلولی که مهار کننده تومور هستند واکنش داده و آن‌ها را مهار می‌کنند [۱۵].

در سلول‌های فیبروبلاست (Fibroblast Cells)، HCMV پروتواونکوژن‌های (Proto Oncogenes) سلولی و سایکلین‌ها (Cyclins) و کینازهای (Kinases) درگیر در تقسیم سلولی مثل C-foc، C-jun، سایکلین B را فعال می‌کند. این ویروس همچنین باعث تولید عامل‌های رونویسی سلولی مثل NF-kB

(Nuclear Factor- kappa B) می‌شود که NF-kb باعث بقای سلول‌های طبیعی و سرطانی، در نتیجه ایجاد مسیر پس‌نورد مثبت برای رونویسی از ژن‌های بسیار زودرس آن است [۱٦]. HCMV باعث فرار ایمنی سلول‌های آلوده و ایجاد یک محیط امن از نظر ایمنی برای ایجاد تومور می‌شود. در فرآیند القای تومور، از کار انداختن سیستم ایمنی میزبان یک گام مهم و اساسی است. این ویروس دارای ژن‌هایی است که پروتئین‌های حاصل از آن باعث عدم کارآیی سیستم ایمنی در تشخیص سلول‌های خودی از سلول‌های توموری است [۱۷]. گلیکوپروتئین‌های HCMV ممکن است در ایجاد تومور نقش داشته باشد. گلیکوپروتئین B فراوان‌ترین گلیکوپروتئین این ویروس است که از بیشترین خاصیت ایمنی‌زایی برخوردار است. شواهد نشان می‌دهد گلیکوپروتئین B مستقیماً به گیرنده عامل رشد پلاکتی متصل شده و آن را فعال می‌کند که گیرنده عامل رشد پلاکتی در چندین بدخیمی از جمله گلیوما افزایش زیادی نشان می‌دهد. افزایش تولید گلیکوپروتئین B در گلیوما به اثبات رسیده است [۱۸، ۱۹].

موارد ذکر شده بالا از جمله مواردی است که شک دانشمندان را در نقش HCMV در تومورهای مختلف از جمله گلیوما کمتر کرده است، به‌ویژه این‌که ژنوم این ویروس در بافت توموری وجود دارد اما در بافت سالم مجاور تومور وجود ندارد [۱٦].

مواد و روش‌ها

بیماران و نمونه‌ها

برای انجام این تحقیق به بخش جراحی اعصاب بیمارستان امام خمینی تهران مراجعه و همه بیمارانی که در سال ۹۰ و ۹۱ با تشخیص گلیوما برای عمل مراجعه کردند، انتخاب شدند و اطلاعات آن‌ها بررسی شد. سپس با مراجعه به بخش پاتولوژی بیمارستان و انتخاب بلوک پاتولوژی بیماران از آرشیو آزمایشگاه پاتولوژی، این بلوک‌ها به قطعات ٤ میکرومتری برش داده شد و برای استخراج DNA استفاده شد. لازم به ذکر است که گلیوم بودن تک تک نمونه‌ها توسط پاتولوژیست تأیید شد. از مرداد ۹۰ تا خرداد ۹۱، ۱۸ بیمار با تشخیص گلیوما به بخش جراحی اعصاب برای عمل مراجعه نمودند که ۱۰ نفر از بیماران مرد و ۸ نفر از آنان زن بودند. ٤ نفر از این ۱۸ نفر طی مراحل تحقیق فوت شدند.

استخراج DNA از نمونه‌ها

به‌منظور استخراج DNA، مقدار ۲۵ میلی‌گرم از نمونه هر بیمار با استفاده از کیت QIAamp DNA mini Kit (Qiagen، آلمان) و براساس دستور العمل شرکت سازنده تخلیص شد. در نهایت DNA استخراج شده در حجم ۵۰ میکرولیتر از بافر شستشوی کیت حل شد.

تعیین حساسیت تحلیلی

حساسیت تحلیلی (Analytical Sensitivity) یا حد تشخیص (Limit of Detection: LOD) عبارت است از کمترین مقدار از یک ماده مورد بررسی در یک نمونه که می‌توان آن را دست کم در ۹۵ درصد موارد تشخیص داد. به‌منظور تعیین حساسیت تحلیلی روش راه‌اندازی شده، از نمونهٔ کنترل حاوی DNA ویروس سیتومگال متعلق به کمپانی Vircell کشور اسپانیا استفاده شد. بدین‌صورت که براساس دستورالعمل کمپانی سازنده، غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ کپی در واکنش از DNA ویروسی در آب با درجهٔ خلوص مناسب برای واکنش‌های زیست‌شناسی مولکولی (Molecular Biology) تهیه شد. سپس شش تکرار از هر غلظت در سه روز مختلف بررسی و نتایج به‌وسیلهٔ آنالیز رگرسیون پروبیت (Probit Regression Analysis) ارزیابی شد.

تعیین ویژگی تحلیلی

به‌منظور تعیین ویژگی تحلیلی روش PCR کیفی راه‌اندازی

شده، علاوه بر تأیید درستی اتصال آغازگرها (Primers) به‌وسیلهٔ نرم‌افزار BlastN در پایگاه NCBI (National Center of Biotechnology Information)، از یک پنل ویژگی حاوی اسید نوکلئیک استخراج شده از برخی از ویروس‌هایی که به‌صورت بالقوه امکان ایجاد تداخل با واکنش طراحی شده را دارند، استفاده شد. این ویروس‌ها شامل HSV-1 (Herpes Simplex Virus)، HSV-2، VZV (Varicella Zoster Virus)، EBV (Epstein-Barr Virus)، HHV-6 (Human Herpes Virus)، HHV-7، پولیوما ویروس BK (Polyomavirus BK)، پولیوماویروس ویروس JC، ویروس آدنو (Adenovirus)، پارووویروس B19 (Parvovirus B19)، HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus)، HTLV-1 (Human T-Lymphotrophic Virus)، HBV (Hepatitis B Virus)، HCV (Hepatitis C Virus)، و TTV (Torque Teno Virus) بودند.

انجام واکنش‌های Real-Time PCR کیفی

برای طراحی آغازگرهایی که قادر به شناسایی سویه‌های مختلف ویروس سیتومگال باشد، از توالی ژن US28 این ویروس استفاده شد. بدین صورت که تمامی توالی‌های موجود این ژن از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI به‌دست آمد و سپس مراحل هم‌ردیفی چندگانه و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار AlleleID ۷ صورت گرفت. آغازگرهای طراحی شده یک قطعه ۱۸۵ نوکلئوتیدی از ژن مذکور را تکثیر می‌کند. توالی آغازگرهای اختصاصی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های HCMV US28

نام آغازگر	توالی آغازگرها	اندازهٔ محصول PCR
آغازگر مستقیم	5`-TTGTTTCTGTACGGCGTTGTC-3`	۱۸۵ جفت‌باز
آغازگر معکوس	5`-GAGTTGTGATCTAGGAGGTATTGC-3`	

جدول ۲ جزئیات مواد به‌کار رفته در واکنش Real-Time PCR و برنامه چرخه‌های حرارتی دستگاه

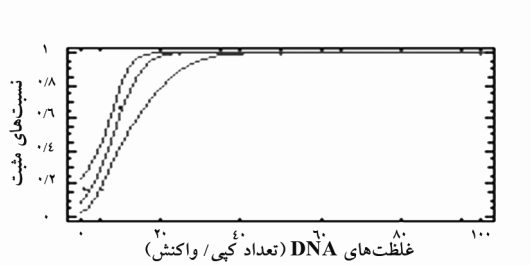
نوع ماده	غلظت	حجم در یک واکنش (واحد بین‌المللی)		برنامهٔ چرخه‌های حرارتی دستگاه			
				مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
H_2O	–	۱۳/۹	تکثیر	فعال شدن آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱
بافر ۱۰x PCR + ۱۵ میلی‌مولار $MgCl_2$	۱ X	۲/۵		واسرشتگی	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۰ ثانیه	٤۵
$MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)	۲/۵ میلی‌مولار	۱/۵		اتصال	۵۸ درجه سانتی‌گراد	۱۰ ثانیه	
dNTP (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۲ میلی‌مولار	۰/۵		طویل‌سازی+ قرائت فلورسانس	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه	
آلبومین سرم گاوی (۵۰۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر)	۱۰ نانوگرم/ میکرولیتر	۰/۵					
سایبر گرین I (۱/۱۰۰۰)	–	۰/٤					
آغازگر مستقیم	۰/۲ میکرومولار	۰/۲	منحنی ذوب	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ ثانیه		۱
آغازگر معکوس	۰/۲ میکرومولار	۰/۲		٦۰ درجه سانتی‌گراد	۱۵ ثانیه		قرائت مداوم
Taqمراز DNA	۱ واحد	۰/۳		۹٦ درجه سانتی‌گراد	۵ ثانیه		
DNA الگو	–	۵					
حجم نهایی	–	۲۵ میکرولیتر		خنک‌سازی	٤۰ درجه سانتی‌گراد	٤۰ ثانیه	۱

پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش، آزمون PCR کیفی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و شامل اجزای زیر بود: ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (Qiagen، آلمان)، ۰/۲ میکرولیتر از هریک از آغازگرها، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز *Taq* (Qiagen، آلمان)، ۰/۵ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی و ۰/٤ میکرولیتر سایبرگرین (Syber Green) پروفایل دمایی تکثیر در دستگاه LightCycler®1.2 (Roche، آلمان) انجام شد و به‌صورت واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ٤٥ چرخهٔ سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. در پایان چرخه‌های تکثیر، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب با افزایش تدریجی دما از دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۰/۱ درجه سانتی‌گراد/ ثانیه صورت گرفت. وجود نقاط اوج (Peaks) در دمای ۸۹ درجه سانتی‌گراد نشان دهنده تکثیر محصول اختصاصی واکنش است (جدول ۲).

نتایج

نتایج تعیین حساسیت تحلیلی

براساس نتایج حاصل از آزمون رگرسیون پروبیت پایین‌ترین رقت از DNA ویروسی که با احتمال بیش از ۹۵ درصد قابل تشخیص است معادل ۱۷/٦ کپی در واکنش (فاصله اطمینان: ۹۵ درصد= ۲۹/٦-۱۳/٤) است. شکل ۱ نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون پروبیت که به‌وسیلهٔ نرم‌افزار آماری Statigraphics Plus 5.0 محاسبه شده است را نشان می‌دهد.



شکل ۱ نتایج رگرسیون پروبیت به‌منظور تعیین حساسیت تحلیلی روش PCR کیفی

نتایج تعیین ویژگی تحلیلی

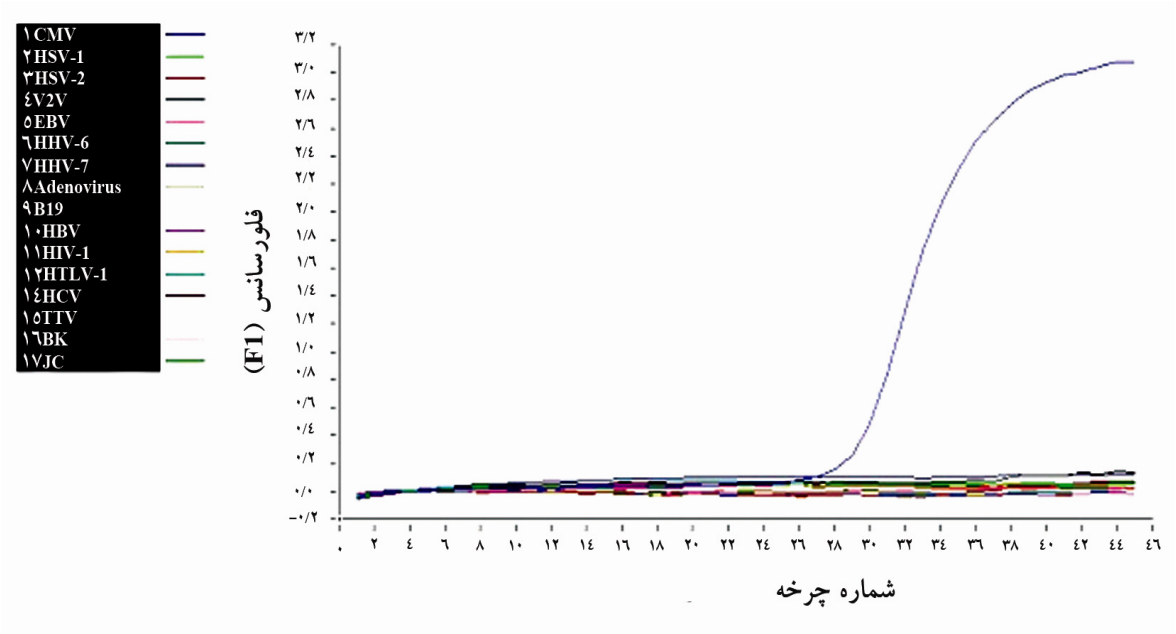
بررسی نتایج BlastN نشان می‌دهد که آغازگر طراحی شده تنها به توالی ژن US28 ویروس HCMV متصل می‌شود و هیچ‌گونه واکنش متقاطع با سایر توالی‌های موجود در پایگاه‌های نوکلئوتیدی NCBI دیده نشد. به‌علاوه؛ بررسی پنل ویژگی نشان داد که الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده قادر به تکثیر برخی از ویروس‌هایی که به‌طور بالقوه دارای امکان واکنش متقاطع هستند، نیست و تنها توالی HCMV را تکثیر می‌نماید (شکل ۲).

نتایج Real-Time PCR کیفی

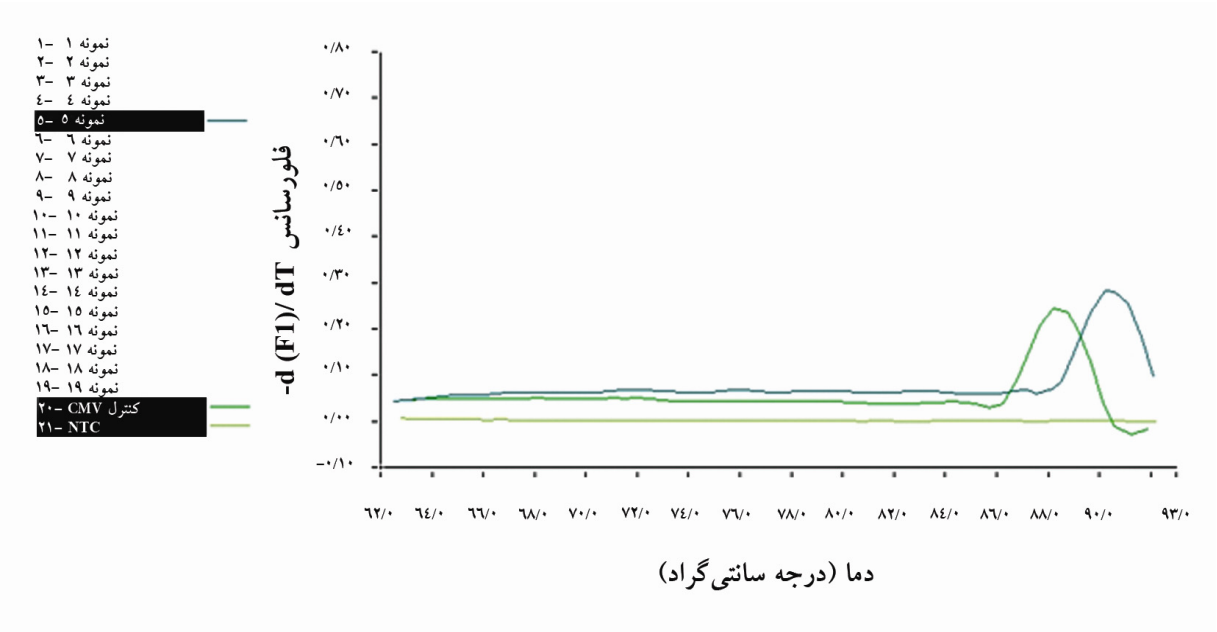
۱۸ بیمار از نظر وجود HCMV در بافت توموری مغز آن‌ها بررسی شدند. اطلاعات مربوط به بیماران شامل جنس، سن، درجه تومور، مدت بیماری، عمر بیمار و نتیجه Real-Time PCR بیماران در جدول ۳ به نمایش درآمده است.

از تعداد ۱۸ بیمار، ۱۰ بیمار مرد و ۸ بیمار زن بودند. میانگین سنی بیماران ۳۹/۵ سال بود. کم سن‌ترین بیمار ۹ سال و سالمندترین بیمار ۵۹ سال داشتند. ۱۰ نفر از بیماران (۵۵/۵ درصد) در درجه ۲ بیماری گلیوما بودند. ٤ نفر از بیماران (۲۲/۲ درصد) در درجه ٤ بیماری که شدیدترین و بدخیم‌ترین نوع بیماری گلیوماست و بقیه بیماران (۲۲/۳ درصد) در درجه ۱ و ۳ بیماری قرار داشتند. نتیجه Real-Time PCR کیفی روی ٤ بیمار از ۱۸ بیمار مثبت شد که حدود ۲۲/۲ درصد

است (شکل ۳). ۲ نفر از بیمارانی که HCMV آن‌ها مثبت شد، فوت شدند.



شکل ۲ تعیین ویژگی تحلیلی آغازگرهای اختصاصی ژن US28 با استفاده از پنل ویژگی



شکل ۳ بیمار مثبت که با منحنی آبی در مقابل منحنی سبز که کنترل مثبت است مشخص شده است.

جدول۳ اطلاعات مربوط به بیماران مورد مطالعه و نتایج Real-Time PCR آن‌ها

بیمار	سن بیمار هنگام جراحی	جنس	درجه بیماری	مدت زمان بیماری	عمر بیمار	HCMV PCR
۱	۳۰	مرد	۲	٦۰ ماه	فوت شده	+
۲	٤۷	زن	۳	۲۳ ماه	در قید حیات	-
۳	۳۵	زن	۲	۲۳ ماه	در قید حیات	-
٤	۳۰	مرد	۲	۷۱ ماه	در قید حیات	-
۵	۵۵	زن	٤	۷ ماه	در قید حیات	+
٦	۵۹	مرد	٤	۱۸ ماه	فوت شده	-
۷	۵۷	زن	٤	۱۳ ماه	فوت شده	+
۸	۳۳	مرد	۲	۳ ماه	در قید حیات	-
۹	۳۹	زن	۲	۱ ماه	در قید حیات	-
۱۰	۵۰	مرد	٤	۱۱ماه	فوت شده	-
۱۱	۳۳	مرد	۲	۳ ماه	در قید حیات	-
۱۲	۳۲	مرد	۲	٤ ماه	در قید حیات	-
۱۳	٤۰	زن	۲	٦۳ ماه	در قید حیات	-
۱٤	۹	مرد	۱	۲ ماه	در قید حیات	-
۱۵	۳٦	مرد	۲	۲۵ ماه	در قید حیات	-
۱٦	٤۵	زن	۳	۳ ماه	در قید حیات	-
۱۷	۳٦	مرد	۲	۲ ماه	در قید حیات	+
۱۸	٤٤	زن	۳	۸ ماه	در قید حیات	-

بحث

در این تحقیق وجود HCMV را در حدود ۲۲/۲ درصد از بیماران مبتلا به گلیوما ثابت شد. همان‌طور که گفته شد واکنش Real-Time PCR کیفی که در تحقیق حاضر استفاده شد قادر به شناسایی ۱۸ کپی از ژنوم این ویروس در هر واکنش است؛ بنابراین یک آزمون حساس برای تشخیص HCMV در نمونه‌های بافتی است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابق با نتایج برخی محققین دیگر است [۲۰، ۲۱] که درصدهای پایین از عفونت این ویروس را در تومورهای مغزی گلیوما به اثبات رسانده‌اند. با توجه به دشوار بودن جداسازی ژنوم HCMV از بافت‌های سرطانی محققین عنوان عفونت بسیار خفیف (Microinfection) را برای عفونت این سلول‌ها به‌کار می‌برند [۱٦]. وجود ژنوم این ویروس در بافت سرطانی و عدم وجود آن در بافت سالم مجاور شک دانشمندان را در نقش آن در سرطان‌های مختلف از جمله گلیوما کمتر کرده است [۱٦].

پایین‌تر بودن درصد جداسازی HCMV در این مطالعه نسبت به برخی از مطالعات دیگر را می‌توان به استفاده از روش‌های دیگر شناسایی ژنوم مثل دو رگه‌سازی درجا (In Situ Hybridization) و Nested PCR، مطالعه در جمعیت‌های مختلف و عفونت با سویه‌های متفاوت این ویروس در تومورهای مغزی گلیوما نسبت داد. شدت و درجه بیماری گلیوما نیز ممکن است در نتایج مطالعات تأثیر گذار باشد. در بعضی از مطالعات [۱۸، ۲۰] در بیش از ۹۰ درصد از بیمارانی که در درجه ٤ بیماری گلیوما قرار داشتند HCMV را جدا کردند. بیشتر بیماران در تحقیق حاضر در مراحل ابتدایی‌تر بیماری قرار داشتند. به‌نظر می‌رسد می‌توان مجادله نمود که باید نسبت متعادلی بین شیوع آنتی‌بادی سرمی ضد HCMV در یک جامعه آماری با نسبت جداسازی آن از تومورهای همان جامعه آماری وجود داشته باشد. به‌عنوان مثال جداسازی تقریباً صد در صدی HCMV از تومورهای مغزی جامعه‌ای که شیوع

آنتی‌بادی سرمی در آن ۵۰ درصد است ممکن است دشوار باشد. ناحیه ژنی که از آن برای تهیه آغازگر واکنش Real-Time PCR استفاده می‌شود نیز می‌تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد. در تحقیقی مشاهده کردند که موش‌های تراریخته که توانایی بیان ژن HCMV US28 را در روده داشتند مبتلا به آدنوکارسینومای روده (Intestine Adenocarcinoma) شدند. به همین دلیل US28 ممکن است به عنوان یک ژن تومورزا در سلول آلوده عمل کند [۱۸]. بیان ژن US28 در سلول‌های آلوده به HCMV باعث افزایش تولید اینترلوکین ٦ (Interleukin 6: IL-6) و عامل رشد اندوتلیال مویرگی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) و به دنبال آن افزایش STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) فسفوریله، کاهش پاسخ‌های ضد تومور، کاهش فعالیت‌های سلول‌کشی سلول‌های کشنده طبیعی، ماکروفاژ، نوتروفیل و سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells) می‌شود [۱۸]. عفونت HCMV در رده‌های سلولی گلیوما باعث تولید IL-10 ویروسی، در نتیجه فعال شدن ژن‌های بسیار زودرس این ویروس در مونوسیت‌ها و تبدیل آن‌ها به فنوتیپ M2 ماکروفاژ می‌شود. فنوتیپ M2 با تولید مقادیر زیادتری از VEGF و رگ‌زایی شدیدتر، همچنین تولید TGF-β (Transforming Growth Factor beta) باعث سرکوب ایمنی در بافت عصبی مغز شده و ممکن است در روند ایجاد گلیوما نقش داشته باشد [۱۸]. به همین دلیل از ناحیه ژنی US28 ژنوم این ویروس برای تهیه آغازگر واکنش Real-Time PCR استفاده شد. استفاده از یک روش دیگر به صورت موازی با روش PCR مثل شناسایی پروتئین‌های مختلف HCMV با کمک آنتی‌بادی و با روش ایمنوهیستوشیمی (Immunohistochemistry) ممکن است درصد شناسایی این ویروس را افزایش دهد [۲]. البته نتایج PCR و ایمنوهیستوشیمی با توجه به آبشاری بودن بیان ژن‌های خانواده هرپس ویروس‌ها و عبور مرحله به مرحله عفونت سلولی از مراحل اولیه به مراحل نهایی، ممکن است با یکدیگر هم‌خوانی نداشته باشد [۲]. استفاده از نمونه‌های تازه بافتی به جای نمونه‌های پارافینه برای استخراج DNA ویروس نیز ممکن است نتایج را تحت تأثیر قرار داده و درصد جداسازی را افزایش دهد چون استفاده از بافت پارافینه گاهی باعث آسیب به ژنوم طی فرآیند استخراج می‌شود. همچنین استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر می‌تواند آمار صحیح‌تری از وجود این ویروس در بافت توموری بیماران ارایه دهد. به هر حال با همین درصد پایین جداسازی HCMV از بافت تومور مغز نیز می‌توان گلیوما را به لیست بیمارانی که درگیر با این ویروس هستند اضافه کرد و از یک منظر جدید به این ویروس نگاه کرد. آلودگی با HCMV ممکن است در دراز مدت این تهدید را برای بدن به‌وجود آورد تا با ایجاد یک زمینه مناسب که روند مولکولی آن ذکر شد سلول‌های گلیال مغز را به سمت سرطانی شدن سوق دهد. در صورتی که بتوان با آزمایش‌های حساس‌تر نقش این ویروس را در گلیوما به اثبات رساند، استفاده از طب پیشگیرانه می‌تواند کمک زیادی در جلوگیری از این روند نماید و با استفاده از یک واکسن مناسب و ایجاد ایمنی می‌توان نه فقط از گلیوما بلکه از تومور سایر نواحی بدن جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته ویروس‌شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است. نویسندگان از کلیه عزیزانی که در تمام مراحل انجام این تحقیق همکاری داشتند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Mocarski ES, Jr, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2701-72

[2] Lucas KG, Bao L, Bruggeman R, Dunham K, Specht C. The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. J Neurooncol 2011; 103(2): 231-8.

[3] Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. Neuro Oncol 2001; 3(3): 152-8.

[4] Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 2010; 60(3): 166-93.

[5] Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. Am J Med 2003; 114(8): 675-84.

[6] Connelly JM, Malkin MG. Environmental risk factors for brain tumors. Curr Neurol Neurosci Rep 2007; 7(3): 208-14.

[7] Zheng T, Cantor KP, Zhang Y, Chiu BC, Lynch CF. Risk of brain glioma not associated with cigarette smoking or use of other tobacco products in Iowa. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10(4): 413-4.

[8] Huncharek M, Kupelnick B, Wheeler L. Dietary cured meat and the risk of adult glioma: a meta-analysis of nine observational studies. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2003; 22(2): 129-37.

[9] Savitz DA, Checkoway H, Loomis DP. Magnetic field exposure and neurodegenerative disease mortality among electric utility workers. Epidemiology 1998; 9(4): 398-404.

[10] Cavenee WK. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. J Neurosurg 2000; 92(6): 1080-1.

[11] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 2005; 64(6): 479-89.

[12] Luo MH, Hannemann H, Kulkarni AS, Schwartz PH, O'Dowd JM, Fortunato EA. Human cytomegalovirus infection causes premature and abnormal differentiation of human neural progenitor cells. J Virol 2010; 84(7): 3528-41.

[13] Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. J Virol 2006; 80(18): 8929-39.

[14] Luo MH, Schwartz PH, Fortunato EA. Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection. J Virol 2008; 82(20): 9994-10007.

[15] Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity.

Cancer Res 2008; 68(3): 724-30.

[16] Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a tumor promoter? Virus Res 2011; 157(2): 193-203.

[17] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. Immunology 2006; 119(2): 254-64.

[18] Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. Nature 2008; 455(7211): 391-5.

[19] chell DA, Xie W, Schmittling R, Learn C, Friedman A, McLendon RE, Sampson JH. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. Neuro Oncol 2008; 10(1): 10-8.

[20] Lau SK, Chen YY, Chen WG, Diamond DJ, Mamelak AN, Zaia JA, Weiss LM. Lack of association of cytomegalovirus with human brain tumors. Mod Pathol. 2005; 18(6): 838-43.

[21] Poltermann S, Schlehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. Lack of association of herpesviruses with brain tumors. J Neurovirol. 2006; 12(2): 90-9.

[22] Rahbar A, Stragliotto G, Orrego A, Peredo I, Taher C, Willems J, Söderberg-Naucler C. Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma multiforme associates with patient survival; -a case-control study. Herpesviridae 2012; 3: 3.