

Determining the Relationship between Epstein Barr Virus and Nasopharyngeal Carcinoma by Polymerase Chain Reaction

Masoud Hamidi¹,
Mohammad Shayani Nasab²,
Mehrdad Hajiloeei³,
Arash Dehghan⁴

¹ Young Researchers & Elites Club, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran

² Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences and Health Services, Hamedan, Iran

³ Department of Immunology, Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences and Health Services, Hamedan, Iran

⁴ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences and Health Services, Hamedan, Iran

(Received November 28, 2013 ; Accepted March 10, 2013)

Abstract

Background and purpose: The association of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and Epstein-Barr virus (EBV) was firmly established as early as 1973. A clear understanding of its etiology is still lacking, but nasopharyngeal carcinoma is widely suspected to be the result of both a genetic susceptibility and exposure to environmental factors or Epstein-Barr virus infection. NPC is more prevalent in young age and Iran is a country with young population, therefore we set forth to study the level of infection with EBV.

Materials and methods: A 25-person group of NPC patient as the case group and a 25-person group of patients considered to be at risk of developing NPC as the control group were studied. DNA extraction of the tissue samples kept at hospital and laboratory archives was done as template in PCR.

Results: The mean ages of patients in case and control groups were 44.64 and 32.28 years, respectively. In case group 23 patients were positive for EBV-DNA while in control group 12 patients were positive for EBV-DNA.

Conclusion: Our data demonstrates that EBV is present at the site of tumor development in low-risk population. This survey supports the concept of NPC pathogenesis as a multifactorial process.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma Epstein Barr virus, Polymerase chain reaction.

میزان عفونت EBV با سرطان نازوفارنکس به روش PCR

مسعود حمیدی^۱
محمد شایانی نسب^۲
مهرداد حاجیلویی^۳
آرش دهقان^۴

چکیده

سابقه و هدف: ارتباط بین سرطان نازوفارنکس با ویروس اپشتین-بار اولین بار در سال ۱۹۷۳ مشخص شد. تصویر روشنی از علت این سرطان وجود ندارد؛ به احتمال زیاد سرطان نازوفارنکس را نتیجه استعدادهای ژنتیکی و در معرض عوامل محیطی بودن و یا عفونت با ویروس اپشتین بار می‌دانند. به دلیل شیوع بالای سرطان نازوفارنکس در سنین جوانی از یک سو و جوان بودن جمعیت کشور ما از سوی دیگر، این مطالعه را به منظور تعیین میزان عفونت ویروس اپشتین بار با سرطان نازوفارنکس طرح ریزی نمودیم.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی-مقطعی بوده که ۲۵ بیمار مبتلا به سرطان نازوفارنکس به عنوان گروه مورد و ۲۵ نفر از بیمارانی که احتمال ابتلاء به سرطان نازوفارنکس را داشته‌اند به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. در انجام تحقیق، روش استخراج DNA از نمونه‌های بافتی که در آزمایشگاه‌های بیمارستانی و آزمایشگاهی نگهداری شده‌اند و استفاده از آن به عنوان الگو در آزمون PCR، بهینه سازی و انجام شد.

یافته‌ها: در گروه مورد میانگین سنی بیماران ۴۴/۶۴ سال و در گروه شاهد میانگین سنی بیماران ۳۲/۲۸ سال بود. در گروه مورد، ۲۳ مورد حاوی EBV-DNA و ۲ نمونه فاقد آن بودند، در حالی که در گروه کنترل، ۱۳ بیمار دارای EBV-DNA و ۱۲ مورد فاقد آن تشخیص داده شدند.

استنتاج: اطلاعات حاصله نشان می‌دهد که ویروس اپشتین بار در محل توسعه تومور در جمعیت با خطر پذیری پایین (گروه کنترل) حضور دارد و این فرض را که آسیب شناسی سرطان نازوفارنکس فرآیندی چند فاکتوری است تقویت می‌کند.

واژه های کلیدی: سرطان نازوفارنکس، ویروس اپشتین بار، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

مقدمه

ناحیه سر و گردن می‌باشد. سر و گردن که در سنین بالا شایع هستند بیشتر سنین میان‌سالی را گرفتار می‌کند و رتبه ششم را از نظر میزان مرگ و میر در هنگ کنگ در سال ۲۰۰۴ داشته است (۱). سرطان نازوفارنکس تومور

سرطان نازوفارنکس (Nasopharyngeal Carcinoma: NPC) که از سلول‌های اپیتلیالی منشأ می‌گیرد در کشورهای جنوب شرق آسیا مانند مالزی دومین سرطان شایع مردان (بعد از سرطان ریه) بوده و شایع‌ترین سرطان

E-mail: m.hamidi@jau.ac.ir

مؤلف مسئول: مسعود حمیدی - همدان: باشگاه پژوهشگران جوان

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

۲. گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳. گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴. گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۱۱/۱۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

ارتباط بین سرطان نازوفارنکس با ویروس اپشتین-بار به طور قطع در اوایل سال ۱۹۷۳ تأیید شده است؛ ولی با این حال نقش این ویروس در آسیب شناسی NPC هنوز مورد بحث می باشد (۷). مردان نسبت به زنان ۲ تا ۳ برابر بیش تر ریسک ابتلای به این بیماری را دارند (۲). تشخیص NPC اغلب به خاطر علائم بالینی غیر اختصاصی و سختی مشاهده نازوفارنکس با مشکل روبرو است. زخم های ابتدایی معمولاً در زیر غشای موکوسی هستند و در آزمایش آندوسکوپی اغلب تشخیص داده نمی شوند. بسیاری از تومورها یا در مراحل پایانی بیماری دیده می شوند و زمانی که به صورت متاستازهای سلول فلسی گردن که اغلب آسیب شناسی واضحی در محل ابتدایی هم ندارند از نگاه تشخیصی مخفی می مانند. بنابراین تشخیص زودهنگام NPC، کارآیی درمان را افزایش داده و میزان ابتلاء و وقوع متاستاز را کاهش می دهد (۸). در این رابطه تکنیک PCR^۱ وسیله مؤثری برای تشخیص می باشد (۹).

بر این اساس شاید بتوان با اثبات وجود ژنوم EBV در بیمارانی که تشخیص NPC در آنها اثبات شده، زمینه ای برای تحقیقات بعدی فراهم نمود. بدین صورت که مثلاً با انجام تست های تشخیص مولکولی در بیمارانی که در آنها شک بالینی به NPC وجود دارد تشخیص اولیه تقویت گردد و پزشک را در جهت تصمیم گیری برای اقدامات بعدی، از جمله انجام یا عدم انجام بیوپسی از نازوفارنکس یا غدد لنفاوی یاری نماید. شاید بتوان حتی از آزمون های مولکولی مانند PCR به عنوان تست غربالگری در بین افرادی که علائم پیشنهادکننده این بیماری را دارند استفاده نمود. شکی نیست هرچه اطلاعات و نگرش ما نسبت به بیماری و ابعاد مختلف آن جامع تر و وسیع تر باشد به تشخیص زودرس منجر شده و بالطبع درمان نتیجه بخش تر خواهد بود به خاطر شیوع بالای سرطان نازوفارنکس در سنین جوانی از یک سو و جوان بودن جمعیت کشورما

بدخیم اپی تلیال فضای پشت بینی است که از نظر هیستوپاتولوژی بر اساس طبقه بندی WHO به سه نوع کلاس I (کارسینوم سلولی اسکواآموس)، کلاس II (کارسینوم غیر کراتینی) و کلاس III (کم تمایز) تقسیم می شود. شیوع سرطان نازوفارنکس با موقعیت جغرافیایی، سن و نژاد وابستگی دارد. از آنجا که سرطان نازوفارنکس در جمعیت های خاصی دیده می شود و در کشورهای غربی تقریباً یافت نمی شود، هنوز شناخت کافی از آن وجود ندارد؛ با این حال تحقیقات بر روی تشخیص زود هنگام این سرطان و درمان آن متمرکز شده است. این تومور، بیش تر جوانان و اغلب افرادی را که در کارهای اقتصادی در حال فعالیت اند را مبتلا می کند. بنابراین جامعه پزشکی به دنبال تشخیص زودهنگام این سرطان قبل از شروع لنفادنو- پاتی گردنی که نشانه گسترش تومور است- و درمان آن هستند (۲). سرطان نازوفارنکس، از سرطان های نادر در ایران است و اطلاعات دقیقی از میزان شیوع آن در سطح کشور در دسترس نیست. طی سال های ۱۳۷۵ تا ۱۳۷۸ درصد شیوع این سرطان در استان اردبیل که بیش ترین درصد سرطان های دستگاه گوارش فوقانی در ایران را داراست، ۰/۶ درصد در مردان و ۰/۸ درصد در زنان گزارش شده است (۳، ۴). مهم ترین DNA ویروس هایی که به عنوان انکوژنیک در انسان شناخته شده اند شامل پاپیلوما ویروس ها (HPV)، هیپاتیت B (HBV) و ویروس اپشتین-بار (EBV) می باشد (۵). EBV یک ویروس سرطانزا است که باعث ایجاد بدخیمی های متعددی مثل سرطان نازوفارنکس و لنفوم بورکیت می شود (۶). بیش از ۹۰ درصد جمعیت جوان دنیا به این ویروس آلوده اند. افراد آلوده، مدت طولانی از زندگی حامل این ویروس هستند. EBV از طریق تماس بزاقی منتقل شده و در طی عفونت حاد، اپی تلیوم سنگ فرشی مطبق حنجره را آلوده می کند و در طی عفونت پنهان در درون لنفوسیت های B یافت می شود (۵).

1. Polymerase chain reaction

جدول شماره ۱: سن، جنس، سال نمونه گیری و سرطانی یا غیر سرطانی بودن نمونه های به کار رفته در تحقیق

شماره نمونه	سال نمونه گیری	جنس	سن	سرطان	شماره نمونه	سال نمونه گیری	جنس	سن	سرطان
۱	۸۲	F	۶۳	+	۲۶	۸۷	M	۱۸	-
۲	۸۷	F	۱۸	-	۲۷	۸۷	M	۶۰	+
۳	۸۲	M	۳۰	+	۲۸	۸۷	F	۱۳	-
۴	۸۲	M	۴۶	+	۲۹	۸۶	M	۵۲	+
۵	۸۲	M	۴۱	+	۳۰	۸۷	F	۳۰	-
۶	۸۷	M	۲۱	+	۳۱	۸۸	M	۵۴	+
۷	۸۷	M	۴۳	+	۳۲	۸۷	F	۴	-
۸	۸۷	M	۸۱	+	۳۳	۷۲	F	۴۴	+
۹	۸۷	M	۲۱	+	۳۴	۸۸	M	۶۲	+
۱۰	۸۲	M	۴۲	+	۳۵	۸۷	M	۳۳	+
۱۱	۸۷	M	۲۱	-	۳۶	۷۴	F	۵۳	+
۱۲	۸۷	M	۲۵	-	۳۷	۸۳	M	۶۰	+
۱۳	۸۷	M	۹	-	۳۸	۸۸	F	۲۷	-
۱۴	۸۷	F	۳۱	-	۳۹	۸۱	M	۷۲	-
۱۵	۸۷	F	۱۷	-	۴۰	۸۲	M	۶۶	-
۱۶	۸۷	F	۵	-	۴۱	۷۳	F	۴۸	+
۱۷	۸۷	M	۱۵	-	۴۲	۷۳	F	۳۳	+
۱۸	۸۷	M	۱۴	-	۴۳	۷۳	F	۴۳	+
۱۹	۸۷	F	۱۴	+	۴۴	۸۷	M	۵۶	-
۲۰	۸۷	M	۲۴	+	۴۵	۸۸	M	۵۷	-
۲۱	۸۷	F	۴۹	-	۴۶	۷۴	M	۲۱	+
۲۲	۸۷	M	۲۲	-	۴۷	۸۸	F	۵۶	-
۲۳	۸۷	M	۷۷	+	۴۸	۷۶	F	۵۳	-
۲۴	۸۷	F	۵۰	-	۴۹	۷۹	F	۶۴	-
۲۵	۸۶	F	۱۵	-	۵۰	۷۲	M	۷۰	+

ب) پارافین زدایی و استخراج ژنوم DNA:

پس از اختصاص شماره به هر یک از بلوک‌ها، توسط دستگاه میکروتوم برش‌های ۱۰ میکرونی از هر یک از بلوک‌ها تهیه گردید. پس از قرار دادن برش‌های مربوطه در داخل میکروتیوب (ریزلوله)های ۱/۵ میلی‌لیتری که قبلاً استریل شده‌اند، مراحل پارافین زدایی و استخراج DNA با روش دستی و بر اساس دستورالعمل استاندارد (۱۰) به شرح زیر انجام شد:

۱- 1mL گزبلول به هر کدام از میکروتیوب‌های حاوی برش‌ها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، سانتیفریوژ انجام گرفته و مایع رویی خارج گردید. این مرحله دو بار انجام می‌شد.

۲- 1mL اتانول ۱۰۰ درصد اضافه شد. ادامه کار مانند مرحله قبل صورت گرفت.

۳- 1mL اتانول ۷۵ درصد اضافه شد. ادامه کار مانند مرحله قبل انجام گردید.

از سوی دیگر، این مطالعه را به منظور تعیین میزان همراهی عفونت ویروس اپشتن-بار با سرطان نازوفارنکس طرح ریزی نمودیم.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری، چگونگی انتخاب نمونه، خصوصیات آن‌ها:

این مطالعه توصیفی-مقطعی بوده که در بیمارستان بعثت وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان در سال ۱۳۸۸ انجام شد. در مورد سن و جنس و نتایج آزمون پاتولوژی، از پرونده‌های بیماران استفاده شد و در پرسشنامه‌های از قبل تهیه شده وارد شد؛ همچنین در این مطالعه تماس مستقیمی با بیمار وجود نداشته است و مداخله‌ای در درمان صورت نگرفته و هزینه‌ای جهت این مطالعه به بیمار تحمیل نگردیده است. بر اساس مطالعات قبلی حجم نمونه برای هر دو گروه ۲۵ نفر محاسبه گردید. جهت جمع آوری نمونه‌ها به پرونده‌های بیماران که در آزمایشگاه‌های پاتولوژی خصوصی شهر همدان (رازی و شفا) و آزمایشگاه‌های پاتولوژی بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان که در شهر همدان بایگانی شده‌اند، مراجعه گردید. ۲۵ بلوک پارافینه که بیوپسی نازوفارنکس در مورد آن‌ها انجام شد و از نظر سرطان نازوفارنکس به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، مورد تأیید پاتولوژیست قرار گرفت، به همراه مشخصات آن‌ها که شامل سن، جنس و تاریخ بیوپسی می‌باشد، به عنوان گروه تست استخراج گردید. ۲۵ مورد بیوپسی از بافت نازوفارنکس از پرونده‌های پاتولوژی، که با شک بالینی سرطان نازوفارنکس تهیه شده‌اند به همراه مشخصات ذکر شده در بالا (سن، جنس و تاریخ بیوپسی)، به عنوان گروه شاهد انتخاب شد. اطلاعات مربوط به سن، جنس، سال نمونه‌گیری و سرطانی یا غیر سرطانی بودن آن‌ها در جدول شماره ۱ آمده است.

و پس از آن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در ضمن ویال حاوی سوش استاندارد EBV که در رده سلولی B95-8 کشت داده شده است NCBI (Code: C110) و از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، مورد استخراج DNA قرار گرفت و به عنوان کنترل مثبت در PCR به کار گرفته شد.

ج) کنترل کیفی DNA استخراج شده: در این مرحله قابلیت تکثیر DNA استخراج شده ابتدا توسط PCR، برای ژن بتا- گلوبین انسانی کنترل شد تا نمونه‌های حاوی مقدار کافی DNA، به منظور PCR ژنوم EBV به کار روند. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت (جدول شماره ۳). ۲ میکرولیتر از حجم نهایی را محلول واجد DNA الگو تشکیل می دهد. ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر محلول حاوی dNTP و ۰/۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به هر واکنش افزوده شد. ۲ میکرولیتر از پرایمرهای مربوطه نیز اضافه گردید (جدول شماره ۲). حجم نهایی واکنش به کمک آب مقطر، به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد (جدول شماره ۲). برای انجام الکتروفورز، ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید تهیه شد. برای ساخت بافر پر چگال (Loading Buffer)، از ترکیب ۰/۲۵ درصد برموفنل بلو، ۰/۲۵ درصد زایلین سیانول FF، ۳۰ درصد گلیسرول و آب مقطر استفاده گردید، پس از انجام الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰، مورد بررسی قرار گرفتند که در مجاورت DNA Ladder 100bp که از شرکت فرمتاز و Fermentas تهیه گردید، نمونه ها توسط دستگاه (ژل داک) در زیر Transluminator بررسی گردیدند. باندهای ۲۶۸ نوکلئوتیدی نماینگر مثبت بودن تست است (تصویر شماره ۱).

۴- 1mL از محلول PBS اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، سانتیفریوژ انجام شد و مایع رویی را خارج کردیم. این مرحله نیز دو بار انجام شد. ۴- ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده اضافه شد. محصول حاضر به مدت یک شب در دمای $52^{\circ}C$ نگهداری شده تا بافت‌های قطعه قطعه شده به صورت کامل حل شوند.

۵- ۵۰۰ میکرولیتر فنل اضافه گردید و توسط ورتکس مخلوط شد.

۶- در دور 12000g به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ انجام شد.

۷- مایع رویی توسط پیپت ۱۰۰ میکرولیتری به یک میکروتیوب استریل دیگر منتقل گردید.

۸- یک حجم کلروفرم اضافه شده و توسط ورتکس مخلوط گردید.

۹- در دور 12000g به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ صورت گرفت.

۱۰- مایع رویی با احتیاط به یک میکروتیوب استریل دیگر انتقال یافت.

۱۱- ۰/۱ واحد استات سدیم 3M به میکروتیوب جدید اضافه گردید.

۱۲- ۱ واحد ایزوپروپانول اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگهداری گردید.

۱۳- DNA ته نشین شده در 12000g به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شد.

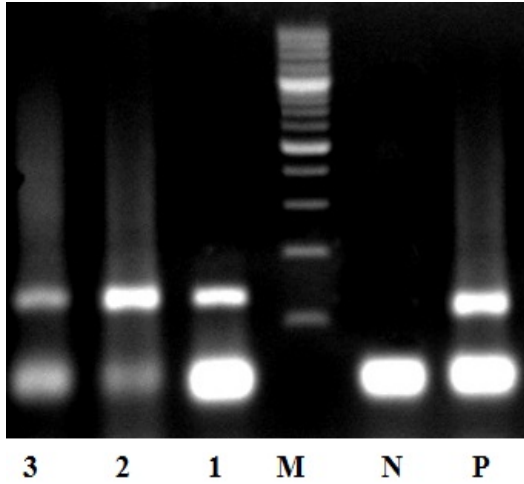
۱۴- پس از خارج کردن مایع رویی، اتانول ۷۵ درصد اضافه کرده و سانتیفریوژ انجام گرفت.

۱۵- DNA استخراج شده پس از خشک شدن کامل در زیر هود، در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شد

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن بتا-گلوبین انسانی و ژن LMP-1

Gene	Primer	Primer sequence	Expected Amplicon Size (bp)	Length(bp)
Beta-globin	GH20	5'-GAA-GAG-CCA-AGC-ACA-GGT-AC-3'		20
	PC04	5'-CCA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'	268	20
LMP-1	Bam HIW1	5'-CCAGACAGC AGCCAATTGTC-3'		20
	Bam HIW2	5'-GGTAGA AGACCC CCTCTT AC-3'	129	20

تجزیه و تحلیل اطلاعات: داده‌های جمع‌آوری شده تحت برنامه SPSS نسخه ۱۶، وارد رایانه گردید و توسط تست‌های آماری Chi-square و t-test تجزیه و تحلیل گردید.



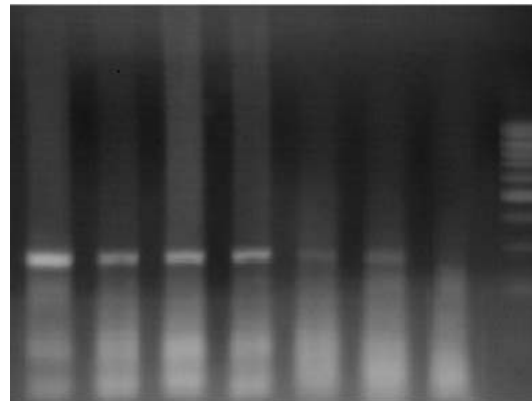
تصویر شماره ۲: عکس ژل الکتروفورز محصول PCR ژن LMP-1 ویروس اپشتین-بار (M: Molecular mass marker، N: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، P: کنترل مثبت (سوش استاندارد EBV)B95-8 تیپ ۱). ۱-۳: شماره نمونه‌ها (همگی باند ۱۲۹ نوکلئوتیدی را نشان داده اند و EBV مثبت هستند).

جدول شماره ۳: شرایط واکنش PCR برای ژن بتا-گلوبین انسانی

Sr. No	Steps	Temp	Time
Step 1	Initial denaturation	97°C	4 min
Step 2	Denaturation	94°C	30 sec
Step 3	Annealing	55°C	30 sec
Step 4	Extension	72°C	30Sec
Step 5	50 cycles from step 2 to step 4		
Step 6	Final Extension	72°C	3 min

جدول شماره ۴: شرایط واکنش PCR برای ژن LMP-1

Sr. No	Steps	Temp	Time
Step 1	Initial denaturation	95°C	5 min
Step 2	Denaturation	95°C	30 sec
Step 3	Annealing	58°C	30 sec
Step 4	Extension	72°C	1 min
Step 5	35 cycles from step 2 to step 4		
Step 6	Final Extension	72°C	5 min



7 6 5 4 3 2 1 M

تصویر شماره ۱: عکس ژل الکتروفورز محصول PCR ژن بتا-گلوبین انسانی. باندهای ۲۶۸ نوکلئوتیدی نماینگر مثبت بودن تست و استخراج موفقیت آمیز است. (M: Molecular mass marker، ۱-۷: شماره نمونه‌ها).

د) شرایط واکنش PCR برای ژن LMP-1 ویروس اپشتین-بار: پس از انجام PCR ژن بتا-گلوبین انسانی، PCR برای ژن LMP-1 ویروس اپشتین-بار انجام شد. در نهایت، شرایط بهینه با مشاهده عکس ژل الکتروفورز، به شرح زیر به دست آمد: واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت. ۲ میکرولیتر محلول واجد DNA الگو، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر محلول حاوی dNTP و ۰/۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به هر واکنش افزوده شد. ۲ میکرولیتر از پرایمرهای مربوطه نیز اضافه گردید (جدول شماره ۲). این پرایمرها ناحیه موسوم به BamHIW را که اغلب در روش‌های تشخیص کیفی EBV به کار می‌رود و در ژنوم ویروس تکرار می‌شود را تکثیر می‌کنند (۱۱). حجم نهایی واکنش را به کمک آب مقطر به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد (جدول شماره ۴). جهت تشخیص و تعیین اندازه محصول واکنش PCR، الکتروفورز مانند روش گفته شده برای ژن بتا-گلوبین انسانی انجام گردید. باندهای ۱۲۹ نوکلئوتیدی نماینگر مثبت بودن تست است (تصویر شماره ۲).

یافته‌ها

جدول شماره ۸: مقایسه فراوانی EBV-DNA⁺ در دو گروه

گروه‌ها	دارای سرطان نازوفارنکس		جمع
	بدون سرطان نازوفارنکس	تعداد (درصد)	
EBV-DNA ⁺	۲۳ (۹۲)	۱۳ (۵۲)	۳۸
EBV-DNA ⁻	۲ (۸)	۱۲ (۴۸)	۱۴
جمع	۲۵ (۱۰۰)	۲۵ (۱۰۰)	۵۰

بحث

حساسیت تشخیص ژن LMP-1 و ویروس اپشتین-بار ۹۲ درصد، اختصاصیت آن ۴۸ درصد، ارزش پیشگویانه مثبت ۶۰/۵۳ درصد و ارزش پیشگویانه منفی ۸۶ درصد به دست آمد. اطلاعات حاصله نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین حضور ژنوم EBV با ابتلا به سرطان نازوفارنکس در جمعیت شهری همدان وجود نداشته و این فرض را که آسیب‌شناسی سرطان نازوفارنکس فرآیندی چندعاملی است را تقویت می‌کند. در ضمن، نتیجه مثبت آزمون PCR در تشخیص سرطان به تنهایی کمک‌کننده نیست و نتیجه منفی آن ارزش بیشتری دارد. ویروس EBV در سلول‌های بافت سرطانی با تپه‌های متعدد و بدون توجه به بافت‌شناسی یا تمایز آن حضور دارد. DNA ویروس همچنین در مرحله پیش‌تهاجمی سرطان نازوفارنکس (مرحله سوم نئوپلازی درون اپیتلیالی نازوفارنکس) حضور دارد. اگر چه EBV تقریباً توسط تمامی افراد بالغ حمل می‌شود و لنفوسیت‌های B تنها مخزن ویروس در این افراد است، اما عفونت همیشگی سلول‌های اپیتلیال با این ویروس تنها در تومورهای بدخیم همچون سرطان نازوفارنکس دیده می‌شود، بنابراین تشخیص DNA ویروس اپشتین-بار در نمونه‌های بیوپسی نازوفارنکس یا متاستازهای گردنی پیشگویی قابل توجهی از سرطان نازوفارنکس را

از ۲۵ بیمار گروه مورد، ۷ نفر زن و ۱۸ نفر مرد بودند و نسبت مرد به زن ۲/۶ محاسبه گردید. میانگین سنی بیماران ۴۴/۶۴ بود. از ۲۵ نفر گروه کنترل، ۱۱ نفر زن و ۱۴ نفر مرد بودند و نسبت مرد به زن ۱/۳ محاسبه شد. میانگین سنی در این گروه ۳۲/۲۸ بود. جداول شماره ۷-۵ مقایسه جنسی و سنی و میانگین سنی در بیماران مبتلا به NPC و غیر آن را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم میزان همراهی EBV در بیماران دارای سرطان نازوفارنکس از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0$) و یافته‌های قبلی در این مورد را اثبات می‌کند. جداول شماره ۸ و ۹ نتایج آزمون‌های آماری (آزمون‌های فراوانی و آزمون‌های Chi-square و t-test) انجام شده را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۵: مقایسه جنسی در بیماران مبتلا به NPC و غیر آن

گروه‌های مورد مطالعه	مرد		زن		جمع
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
دارای سرطان نازوفارنکس	۱۸ (۶۲/۰۷)	۷ (۳۳/۳۳)	۲۵ (۱۰۰)		
بدون سرطان نازوفارنکس	۱۱ (۳۷/۹)	۱۴ (۶۶/۶۶)	۲۵ (۱۰۰)		
جمع	۲۹ (۵۸)	۲۱ (۴۲)	۵۰ (۱۰۰)		

جدول شماره ۶: مقایسه سنی در بیماران مبتلا به NPC و غیر آن

گروه‌های مورد مطالعه	تعداد	میانگین سنی	انحراف معیار	
			معنی‌داری	سطح
دارای سرطان نازوفارنکس	۲۵	۴۴/۶۴	۱۸/۸۹	۳/۷۸
بدون سرطان نازوفارنکس	۲۵	۳۲/۲۸	۲۱/۲۴	۴/۲۴

جدول شماره ۷: مقایسه میانگین سنی بیماران دارای سرطان نازوفارنکس

جنس	تعداد	میانگین سنی	انحراف معیار	
			مرد	زن
مرد	۱۸	۴۰/۹	۱۹/۶	
زن	۷	۳۸/۱	۲۳/۵	

جدول شماره ۹: مقادیر مربوط به حساسیت، اختصاصیت، ارزش پیشگویانه مثبت (PPV) و ارزش پیشگویانه منفی (NPV) آزمون PCR برای ژن LMP-1 و ویروس اپشتین-بار در بیماران با و بدون سرطان نازوفارنکس

حساسیت (sensitivity)	اختصاصیت (Specificity)	ارزش پیشگویانه مثبت (PPV)	ارزش پیشگویانه منفی (NPV)
مقارید دارای سرطان که PCR آن‌ها مثبت است / تمام بیماران سرطانی	مقارید بدون سرطان که PCR آن‌ها منفی است / تمام بیماران غیر سرطانی	مقارید دارای سرطان که PCR آن‌ها مثبت است / تمام مواردی که PCR آن‌ها مثبت است	مقارید بدون سرطان که PCR آن‌ها منفی است / تمام مواردی که PCR آن‌ها منفی است
۹۲ درصد	۴۸ درصد	۶۰/۵۳ درصد	۸۶ درصد

مطرح می‌کند. مطالعات متعددی در خارج از آسیای جنوب شرقی مشخص می‌کند که تشخیص EBV-DNA در غدد لنفی با استفاده از PCR و هیبریداسیون درجا، حساسیت بالا (۸۹-۱۰۰) و اختصاصیت بالا (۷۸-۱۰۰) دارد (۱۲). نمونه‌های اپیتلیال بافت نازوفارنکس که اطراف بافت سرطانی قرار دارند، با روش nested-PCR برای EBV-DNA مثبت شده‌اند در حالی که به وسیله هیبریداسیون درجا گاهی سیگنال‌هایی از هسته سلول‌ها مشاهده شده است، اما این سلول‌های نرمال برای پروتئین‌های ویروسی و RNA های آن، منفی بوده‌اند که نشان دهنده این است که اپی تلیوم نازوفارنکس اولین محل عفونت است چرا که ژنوم ویروسی در این سلول‌ها قرار گرفته است، در حالی که پروتئین‌ها و RNA هایی که برای ایجاد حالت بدخیم ضروری هستند تشخیص داده نشدند (۱۳). Lees JF و همکارانش با کمک روش PCR و ISH (هیبریداسیون درجا) نشان داده‌اند که EBV-DNA در بافت نازوفارنکس افراد سالم با فراوانی ۷۰ درصد وجود دارد. آن‌ها نتیجه‌گیری کرده‌اند که آسیب شناسی سرطان نازوفارنکس یک فرآیند چند مرحله‌ای است (۱۴). اولین مطالعه‌ای که در این رابطه در ایران انجام شده است توسط ندا میرزمانی و همکارانش در سطح بیمارستان‌های رسول اکرم (ص) و فیروزگر بوده که در سال ۸۳ انجام شده است که همراهی EBV با سرطان نازوفارنکس تیپ ۲ و ۳ را در جمعیت مورد مطالعه با فراوانی ۹۵ درصد تأیید کرده‌اند. در میان نمونه‌های آن‌ها تیپ ۱ اصلاً وجود نداشته است (۱۵). مشاهده شده است که در سلول‌های مبتلا به NPC، ژنوم EBV هموزن و یک‌دست بوده و از یک سلول منفرد تکثیر انجام شده است. به کمک روش هیبریداسیون درجا برای عفونت خفته EBV را در تمامی سلول‌های سرطانی و زخم‌های پیش سرطانی با درجه بالا تشخیص داده‌اند اما در زخم‌های پیش سرطانی با درجه پایین این

نوع عفونت را تشخیص نداده‌اند. این اطلاعات دال بر وقوع عفونت خفته EBV در مراحل اولیه تومورزایی NPC است (۱). LMP-1 انکوژن اولیه EBV بوده که تقریباً در ۵۰ تا ۷۰ درصد بیماران دارای NPC تشخیص داده می‌شود. اگرچه بیان این پروتئین در تمامی موارد NPC که با روش‌های ایمونوهیستوشیمی تشخیص داده می‌شود یکسان نیست، اما غربالگری نمونه‌های NPC بوسیله PCR می‌تواند تشخیص ژن LMP-1 را با حساسیت و اختصاصیت بالایی بهبود دهد.

Hao و همکارانش حضور ژنوم اختصاصی EBV را در نمونه‌های سواب نازوفارنکس با حساسیت ۹۴/۷ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد نشان داده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر اختصاصیت تشخیص ژن LMP-1 را ۹۸/۴ درصد و حساسیت آن را ۸۷/۳ درصد گزارش کرده‌اند.

Tsang و همکارانش حساسیت و اختصاصیت تشخیص NPC را با PCR به ترتیب ۹۵/۶ درصد و ۹۸/۷ درصد ذکر کرده‌اند. محمد محمدیان پناه و همکارانش در مطالعه‌ای در شیراز حضور ژن LMP-1 را با PCR در بیوپسی‌های غدد لنفی بیماران دارای NPC با حساسیت ۸۰ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند و در نمونه‌های سرطانی دیگر سر و گردن ژن LMP-1 تشخیص داده نشده است (۱۰).

Yap و همکارانش در تحقیقات خود نتیجه گرفته‌اند که تشخیص EBV به وسیله PCR می‌تواند در کنار آزمایشات آسیب شناختی بافتی (HPE) به کار رود و به عنوان جایگزین HPE مورد استفاده قرار گیرد. به علاوه تشخیص EBV می‌تواند پیشرفت NPC را پیش‌بینی کرده و انجام بیوپسی‌های پشت سرهم را با پیگیری‌های منظم ترغیب نماید. یک مزیت عمده تشخیص EBV-DNA به وسیله PCR، دریافت سریع نتایج در طول ۳ تا ۵ ساعت در مقایسه با HPE است، که زمان طولانی تری را می‌طلبد (۱۲).

Tsai و همکارانش EBV-DNA را به وسیله PCR

بیماران مبتلا به سرطان نازوفارنکس درمان عفونت EBV علاوه بر شیمی درمانی جهت جلوگیری از عود صورت گیرد. ۳- ارتباط سایر ویروس‌های ایجاد کننده عفونت خفته در سلول‌های میزبان بررسی گردد. ۴- قدرت و توانایی سرطان‌زایی هر عامل شیمیایی یا فیزیکی، باید در سلول‌های آلوده به EBV بررسی گردد. ۵- در صورت امکان، درمان عفونت‌های خفته و ویروسی در بیماران غیر سرطانی که EBV-DNA مثبت هستند، مورد توجه قرار گیرد. ۶- پیشگیری از حضور افراد آلوده به EBV در مکان‌ها و یا مشاغلی که احتمال وجود سرطان‌زاهای و موتاژن‌ها در آن بالاست جلوگیری گردد. ۷- تحقیقات بعدی به صورت آینده‌نگر و با تحلیل آماری دقیق‌تر و به صورت کمی (میزان DNA) اجرا شود.

در جریان کسب اطلاعات لازم جهت این تحقیق، نکاتی بیشتر قابل تامل است تا در تحقیقات آینده بتوان به نتایج دقیق‌تر و جامع‌تر رسید: نحوه بایگانی نتایج پاتولوژی با اشکالات عمده‌ای همراه بود و از یک سیستم طبقه‌بندی مشخص پیروی نمی‌کرد که در صورت رفع این مشکلات، دستیابی به اطلاعات آسان‌تر خواهد شد (رایانه‌ای کردن اطلاعات و نتایج پاتولوژی). در ضمن توصیه می‌شود جهت مطالعه دقیق و جلوگیری از فقدان داده‌ها، در موارد تحقیقاتی مورد علاقه بخش‌های مختلف، پرسشنامه‌هایی تهیه شود که اطلاعات مورد نظر آن‌ها از ابتدا با دقت در آن‌ها ضبط گردد تا بدین وسیله از اعمال سلیقه افراد در موارد گوناگون جلوگیری شود و مطالعات استاندارد گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه شاهد انجام شد. از زحمات جناب آقای مهندس مانی که تحلیل آماری این مطالعه را انجام دادند و جناب آقای دکتر ستاری و جناب آقای عباسی که ما را در جمع‌آوری نمونه‌ها یاری فرمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

در ۹۰/۷ درصد نمونه‌های بیوپسی بیماران دارای NPC شناسایی کرده‌اند؛ در حالی که هیبریداسیون درجا برای EBER در ۹۸/۱ درصد نمونه‌ها مثبت بوده است. از طرفی ۱۱/۵ درصد بیماران بدون سرطان، که با شک به NPC از آن‌ها بیوپسی انجام شده بود، برای EBV-DNA توسط روش PCR مثبت شده‌اند؛ اما هیبریداسیون درجا برای EBER در هیچ یک از این بیماران، مثبت نشده است. این محققان نتیجه گرفته‌اند که هیبریداسیون درجا برای EBER جایگزین مناسبی برای تشخیص NPC می‌باشد (۱۶)؛ برخلاف تحقیقاتی دیگر که PCR را مناسب‌تر می‌دانند (۱۲، ۱۷).

به هر حال بسیاری از سوالات در رابطه به نقش EBV در ایجاد NPC هنوز بدون پاسخ مانده‌اند، از جمله: ۱- مشاهدات کنونی در مورد ریسک فاکتورهای محلی و منطقه‌ای، استعداد ژنتیکی و تغییرپذیری سویه‌های EBV که به طور کامل اختلاف گسترده‌ای را که در شیوع NPC دیده می‌شود یا نمی‌تواند توجیه کند. ۲- به طور کامل روشن نیست که در کدام مرحله از تکثیر سلولی (سلول نرمال، آسیب مقدماتی اولیه یا آسیب مقدماتی ثانویه) EBV وارد صحنه می‌شود. اگرچه به خوبی مشخص شده است که EBV می‌تواند سلول‌های اپیتلیال را آلوده کند و سلول‌های پیش ساز مرحله ثانویه راحت‌تر از سلول‌های پیش ساز مرحله اولیه آلوده می‌شوند. ۳- کاملاً واضح نیست که کدام نوع از تغییرات ژنتیکی سلول میزبان در طول تغییر بدخیمی با EBV میان کنش می‌دهد و تا چه حد محیط در توسعه این تغییرات نقش دارد. قبل از این که EBV به عنوان عامل اصلی ایجاد NPC تلقی گردد، باید پاسخ این سوالات را یافت. امید است که این تحقیق قدمی در جهت بررسی‌های بیش‌تر در زمینه‌های مختلف این بیماری باشد. پیشنهاد می‌شود: ۱- پیگیری بیماران مبتلا به غیر سرطان نازوفارنکس که EBV مثبت هستند در فواصل زمانی منظم و به صورت طولانی مدت از نظر ابتلاء به سرطان نازوفارنکس، صورت گیرد. ۲- در

References

1. Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *Lancet* 1994; 343(8893): 333-5.
2. Tay WL, Tan PH, Yip GWC, Bay BH. Nasopharyngeal Carcinoma: an Enigmatic Tumor. *Annu Rev Biomed Sci* 2008; 10: 27-35.
3. Khademi B, Mahmoodi J, Omidvari S, Mohammadianpanah M. Treatment results of nasopharyngeal carcinoma: a 15-year single institutional experience. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006; 18(2): 147-55.
4. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population-based Cancer Registry from Iran. *Int J Cancer.* 2003; 107(1): 113-8.
5. Tahmasebi Fard Z, Khojareh L. Association between Epstein-Barr Virus and Breast Carcinoma. *J Mazand Univ Med Sci.* 2012; 22(95): 85-91
6. Ghasemi M, Abedian Kenari S, Torabizadeh Z, Iri N, Marjani J, Mirabi A. The Relationship between Epstein-Barr Virus (EBV) and Virus-Encoded BARF-1 Gene in Gastric Adenocarcinoma. *J Mazand Univ Med Sci.* 2011; 21(82): 10-6.
7. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53(5): 248-254.
8. Tune CE, Liavaag PG, Freeman JL, van den Brekel MW, Shpitzer T, Kerrebijn JD, et al. Nasopharyngeal brush biopsies and detection of nasopharyngeal cancer in a high-risk population. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 91(9): 796-800.
9. Gulley ML, Raab-Traub N. Detection of Epstein-Barr virus in human tissues by molecular genetic techniques. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117(11): 1115-1120.
10. Khademi B, Mahmoudi J, Monabati A, Maghsoudi B, Ashraf MJ, Mohammadianpanah M, et al. Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma using detection of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 gene in cervical metastatic lymph nodes. *Am J Otolaryngol* 2009; 30(2): 95-100.
11. M. LP. *DNA Viruses: Methods and Protocols.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc; 2005.
12. Yap Y, Hassan S, Chan M, Choo P, Ravichandran M. Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136(6): 986-991.
13. Burgos JS. Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. *Med Oncol* 2005; 22(2): 113-121.
14. Lees JF, Goodeve AC, Arrand JE, Ghosh AK, Jones PH, Arrand JR. Detection of EBV DNA in post nasal space biopsy tissue from asymptomatic EBV seropositive individuals. *J of Med Virol* 2005; 37(1): 30-38.
15. Mirzamani N, Salehian P, Farhadi M, Tehran E. Detection of EBV and HPV in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization. *Exp Mol Pathol* 2006; 81(3): 231-234.
16. Tsai ST, Jin YT, Mann RB, Ambinder RF. Epstein barr virus detection in nasopharyngeal tissues of patients with suspected nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1998; 82(8): 1449-1453.
17. Hao SP, Tsang NM, Chang KP, Ueng SH. Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: detecting LMP-1 and EBNA by nasopharyngeal swab. *Otolaryng Head neck* 2004; 131(5): 651-654.
18. Zur Hausen H. *Infections causing human cancer.* Weinheim Chichester: Wiley-VCH ; John Wiley distributor; 2006. 517.