ردیابی ویروس لوکمیای گاوی در نمونه‌های خون و بافت پارافینه پستان

سینا دباغی[1]، دکتر معصومه حاجی رضایی[2*]

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۴/۰۶

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان، یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در زنان می‌باشد. تحقیقات در بسیاری از نقاط دنیا به منظور بررسی حضور ویروس BLV و ارتباط آن با سرطان پستان بر روی نمونه‌های بافت پارافینه پستان و خون انسانی صورت گرفته است. مطالعه حاضر با هدف ردیابی این ویروس در بافت پارافینه پستان و نمونه‌های خون و بررسی ارتباط این ویروس با سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه مورد- شاهدی که در سال ۱۴۰۱ انجام شد، وجود ژن Gag ویروس BLV در ۲۲۰ نمونه (۱۰۰ نمونه بافت پارافینه پستان و ۱۲۰ نمونه DNA استخراج شده از خون افراد مبتلا به سرطان و سالم) با استفاده از روش Nested-PCR بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶) و آزمون کای دو انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: از بین ۱۲۰ نمونه خون، (۱۳٪) و از بین ۱۰۰ نمونه بافت پارافینه پستان، (۸٪) آلودگی به ویروس BLV را نشان دادند که ردیابی بهتر این ویروس در خون را نشان می‌دهد، ولی در مقایسه بین نمونه‌های بیمار و سالم، فقط نمونه‌های بافت پارافینه رابطه معناداری با سرطان پستان نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: هرچند در نمونه‌های بافت پارافینه پستان جمعیت بررسی شده، بین آلودگی با ویروس BLV و سرطان ارتباط معناداری وجود داشت ($p<۰/۰۵$)، ولی تعداد نمونه‌های مثبت برای این ویروس در نمونه‌های خون بیشتر بود که بیانگر این مطلب است که نمونه‌های خون جهت ردیابی این ویروس در بیماران بهتر است.

کلمات کلیدی: بافت پارافینه پستان، خون، سرطان پستان، ویروس لوکمیای گاوی، Nested PCR

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر معصومه حاجی رضایی؛ دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران. **تلفن:** ۰۳۴-۳۱۳۲۱۳۲۶؛ **پست الکترونیک:** ma.hajirezaei@gmail.com

مقدمه

بیشتر سرطان‌ها در اثر عوامل محیطی و یا تعاملات بین عوامل محیطی و عوامل ارثی ایجاد می‌شوند و برطبق نظر سازمان جهانی بهداشت، حداقل یک سوم موارد سرطان قابل پیشگیری می‌باشد. در بین سرطان‌ها، سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان است و در ایالات متحده حدود ۱۸۳۰۰۰ مورد، سالانه به سرطان پستان مبتلا می‌شوند و حدود ۴۱۰۰۰ نفر، سالانه به‌دلیل سرطان پستان می‌میرند (۱، ۲). میزان ابتلاء به سرطان پستان در ایران ۲۰ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ زن در سال است. آمار بیماران در سن نسبتاً جوان و مراحل پیشرفته در حال افزایش می‌باشد (۳). البته توسعه سرطان شامل تعامل پیچیده بین عوامل محیطی و عوامل ژنتیکی است که از این رو به عوامل محیطی، عوامل خارجی نیز می‌گویند. این عوامل شامل: عوامل فیزیکی یا تشعشعات (مانند اشعه UV و اشعه X)، عوامل شیمیایی (مانند موتاژن‌ها و کارسینوژن‌ها) و عوامل عفونی (مانند باکتری‌ها و ویروس‌ها) است (۴، ۵). بسیاری از ویروس‌ها با سرطان‌های انسانی همراه بوده‌اند و اعتقاد بر این است که تقریباً ۱۲٪ سرطان‌ها دارای علت ویروسی هستند (۶). احتمال نقش ویروس‌ها در سرطان پستان با کشف ویروس تومور پستان موش (MMTV)[1] به‌عنوان عامل ایجاد کننده سرطان پستان موش شروع شد (۷). ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV)[2]، ویروس تومور پستان موش (MMTV) و ویروس اپشتین-بار (EBV)[3] جزء ویروس‌های اولیه منتخب به‌عنوان فاکتور سرطان پستان انسان هستند (۵). همچنین ویروس هرپس سیمپلکس ۱ (HSV-1)[4] به‌عنوان کوفاکتوری در بروز سرطان پستان نقش دارد (۸). یکی از جدیدترین ویروس‌های که تأثیر آن در سرطان پستان بررسی می‌شود، ویروس لوکمیای گاوی (BLV)[5] می‌باشد که برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ حضور آن در زنان مبتلا به سرطان پستان کشف شد (۹). ویروس لوکمیای گاو، یک دلتا رتروویروس است که شبیه به ویروس لوسمی سلول T انسان است (۱۰). ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (HTLV-1)[6] و ویروس لوسمی گاوی (BLV) ویروس‌های انکوژنیک هستند که به‌ترتیب باعث ایجاد لوسمی/ لنفوم سلول T بالغ (ATLL)[7] و لکوسیز انزوتیک گاوی (EBL)[8] می‌شوند. HTLV-1 عمدتاً سلول‌های CD4+ T را آلوده می‌کند، در حالی که BLV لنفوسیت‌های B را آلوده می‌کند. هر دو ویروس ممکن است تکثیر سلولی و بدخیمی را تحریک کنند (۱۱). در ایران، HTLV-1 در استان‌های خراسان، به‌ویژه در مشهد، نیشابور و سبزوار بومی محسوب می‌شود و میزان بروز آن ۴-۲ مورد در هر ۱۰۰ مورد تخمین زده می‌شود (۱۲، ۱۳). ولی با توجه به تحقیق هیراتا و همکاران (۲۰۱۹) هرگونه تأثیر عفونت HTLV-1 بر پیشرفت سرطان پستان به‌نظر می‌رسد ناچیز است (۱۴). BLV دارای مناطق ژنوم معمولی رتروایرال شامل LTR، Gag، Pol (پلیمراز، منطقه رونویسی معکوس، که یک کپی DNA از ژنوم RNA BLV را تولید می‌کند) وEnv است. با این‌حال، برخلاف دیگر رتروویروس‌های آنکوژنیک، دلتا رتروویروس‌ها یک منطقه اضافی به نام Tax (منطقه رونوشت فعال ژن x) دارند، که دارای فعالیت‌های نظارتی است و به سلول‌های میزبان آنکوژنیک می‌شود. Tax با مهار تعمیر DNA و اختلال در مکانیسم‌های کنترل رشد سلولی باعث تغییر بدخیم سلول میزبان می‌شود. لوسمی بالینی در کمتر از ۵٪ گاوهای آلوده توسعه می‌یابد، با این‌حال، لنفوسیت‌های آلوده به BLV در خون و شیر گاوهای آلوده تحت بالینی به‌طور بالقوه آلوده یافت می‌شوند (۱۰). این به احتمال زیاد به‌معنای توانایی انتقال این ویروس از گاوها به انسان است. همبستگی جغرافیایی قابل توجهی بین مرگ‌ومیر سرطان پستان و مصرف گوشت و شیر گاو وجود دارد (۱۵).

در تحقیق جیوانا و همکاران (۲۰۱۳) در کشور کلمبیا، وجود ژن BLV Gag در انسان نشان داده شد (۱۶).

[1] Mouse mammary tumor virus
[2] Human Papilloma Virus
[3] Epstein-Barr Virus
[4] Herpes simplex virus-1
[5] Bovine Leukemia Virus
[6] Human T-lymphotropic virus 1
[7] Adult T Cell Lymphoma/Leukemia
[8] Enzootic bovine leukosis

همچنین در این تحقیق با آنالیز فیلوژنتیک نشان داده شد که شباهت بالایی بین سکانس ژن بسط داده شده و به‌دست آمده از بافت پستان انسان و BLVهای گزارش شده در بانک ژنی که از گاوهایی با لوکوز به‌دست آمده، وجود دارد (۱۶). پژوهش بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۴) در کالیفرنیا نشان داد که خطر آلودگی با ویروس BLV و تکثیر این ویروس در انسان وجود دارد (۱۷). بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند خون انسان می‌تواند به ویروس BLV آلوده باشد و با توجه به آلودگی سلول‌های خونی انسان به این ویروس، انتقال آن به بافت‌ها و ارگان‌های مختلف بدن نیز وجود دارد (۱۸). در ایران طی پژوهش خلیلیان و همکاران (۲۰۱۹) در استان قم، وجود ژن‌هایTax و Gag ویروس BLV در تعدادی از نمونه‌ها ثابت شد (۱۹). اکثر مطالعات صورت گرفته جهت ردیابی این ویروس در انسان بر روی نمونه‌های بافت پارافینه پستان و به تعداد کمتر بر روی خون بوده است و مقایسه‌ای بین نمونه‌های خون و بافت جهت بررسی و ردیابی بهتر این ویروس بر اساس ژن Gag صورت نگرفته است. مطالعه حاضر به‌منظور تعیین نوع نمونه مناسب از بین نمونه‌های خون یا بافت جهت مطالعات آینده برای اولین بار در ایران، با هدف بررسی وجود ژن Gag ویروس BLV در هر دو نوع نمونه بافت پستان و خون افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم و همچنین بررسی احتمال فاکتور خطر بودن این ویروس در هر نوع نمونه انجام گرفت.

روش‌کار

جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج DNA

در این مطالعه مورد-شاهدی جهت ردیابی ژن Gag ویروس BLV، پس از دریافت کد اخلاق (IR.IAU.KERMAN.REC.1400.015)، از ۵۰ نمونه بافت پارافینه پستان تأیید شده مبتلا به سرطان و ۵۰ نمونه بافت پارافینه فاقد سرطان پستان (هر نمونه ۵۰ میلی‌گرم) جمع‌آوری شده در سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰، موجود در بانک بافت بیمارستان‌های افضلی‌پور و باهنر شهر کرمان (دارای محدوده سنی ۸۰-۱۸ سال) و همچنین ۶۰ نمونه از DNA استخراج شده خون افراد مبتلا به سرطان پستان و ۶۰ نمونه از DNA استخراج شده خون افراد سالم (دارای حدوده سنی ۸۰-۱۸ سال موجود در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان) استفاده شد. جهت استخراج DNA از بافت پارافینه پستان، از کیت آزما اکسیر پژوه (ساخت ایران، Cat. No. AEPTDX-1003) استفاده گردید. جهت بررسی غلظت و خلوص DNA استخراج شده از نانو دراپ (analytik jena، آلمان) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز (Labnet، آلمان) استفاده شد. نمونه‌های با غلظت DNAبالای ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر و با نسبت ۲۸۰/۲۶۰ چگالی نوری (OD)[1] بین ۱/۸ تا ۲ جهت ادامه کار انتخاب شدند (۱۹).

طراحی پرایمر و بررسی مولکولی وجود ویروس BLV در نمونه‌ها بر اساس ژن Gag

جهت شناسایی وجود ژن Gag ویروس BLV در نمونه‌های بافت و خون، توالی پرایمرها توسط برنامه Gene Runner (نسخه ۶،۵،۵۲، آمریکا) طراحی و از لحاظ ترمودینامیکی در نرم‌افزارهای Gene Runner و Oligo Analyzer (نسخه ۱،۰،۲) بررسی شدند. به‌منظور تأیید DNA استخراج شده از نمونه‌های انسانی از پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH انسانی موجود در مقالات که یک ژن خانه‌دار می‌باشد، استفاده شد (۱۵). پرایمرها (جدول ۱) جهت سنتز به شرکت سیناکلون فرستاده شدند.

از DNA استخراج شده از خون گاو آلوده به این ویروس که از آزمایشگاه دانش بنیان تأمین آتیه سلامت البرز تهیه شده بود، به‌عنوان نمونه کنترل مثبت برای ویروس BLV و از DNA استخراج شده از خون گاو فاقد ویروس BLV، به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

از تکثیر ژن GAPDH انسانی به‌عنوان کنترل داخلی جهت تأیید نمونه‌های انسانی استفاده گردید. تمامی نمونه‌ها ابتدا با پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH انسانی و سپس با پرایمرهای خارجی ژنGag تکثیر شدند. محصول PCR نمونه‌های دارای باند ۶۵۰ bp برای تکثیر با پرایمر داخلی استفاده شدند.

[1] Optical density

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

شماره	نام الگو	توالی (´۵-۳)	دما	Mer	اندازه محصول
۱	Outer Forward Gag	AATAAGGCACCAGGTTCGCAAG	۶۰/۲۵	۲۲	bp۶۵۰
۲	Outer Reverse Gag	TTGAGGCATCGATAGCATGGTC	۶۰/۲۵	۲۲	
۳	Inner Forward Gag	TGACAACCTTCCCGACGGAGTC	۶۳/۹۸	۲۲	bp ۱۸۵
۴	Inner Reverse Gag	TGTGGACGAGGATTGCAGGCTG	۶۳/۹۸	۲۲	
۵	Forward GAPDH	GCTCGGTGCCTTTAGTGATGG	۶۱/۷۸	۲۱	bp ۲۵۵
۶	Reverse GAPDH	CGATCCTGAGACTTCCACACTG	۶۲/۱۲	۲۲	

مواد و حجم مورد استفاده جهت واکنش‌های بیرونی و داخلی واکنش Nested-PCR و همچنینPCR ژن انسانی در جدول ۲ نشان داده شده است. برای واکنش بیرونی Nested-PCR و همچنین PCR ژن انسانی از ۱/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و برای واکنش درونی Nested-PCR از ۰/۵ میکرولیتر از محصول مثبت شده واکنش بیرونی استفاده گردید.

جدول ۲- مواد و حجم مورد استفاده جهت واکنش‌های بیرونی و داخلی در Nested-PCR و PCR

موارد مورد استفاده	حجم در واکنش بیرونی و PCR(میکرولیتر)	حجم در واکنش درونی (میکرولیتر)
Mater mix	۱۲/۵	۱۲/۵
Primer Forward	۱	۱
Primer Reverse	۱	۱
DNAse & RNAse free water	۹	۱۰
DNA Template	۱	-
محصول PCR واکنش بیرونی	-	۰/۵
Total Volume	۲۵	۲۵

با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (Analytik jena، آلمان) و برنامه‌های دمایی و زمانی، واکنش‌های Nested-PCR و PCR به‌صورت ذیل انجام گردید.
برای ژن بیرونی Gag: یک سیکل برای واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و برای واسرشت ثانویه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه (۳۵ سیکل) و در انتها یک سیکل برای بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گردید.
برنامه دمایی برای ژن درونی Gag در واکنشNested-PCR هم به‌صورت: یک سیکل برای واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، برای واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و در انتها یک سیکل برای بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود.
همچنین واکنش PCR برای ژن انسانی GAPDH به‌صورت یک سیکل برای واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه برای واسرشت ثانویه، اتصال آغازگر در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه (۳۵ سیکل) و در انتها یک سیکل برای بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه بود.
در پایان محصولات Nested-PCR و PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، الکتروفورز (Labnet، آلمان) گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS

(نسخه ۲۶) و آزمون کای دو انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

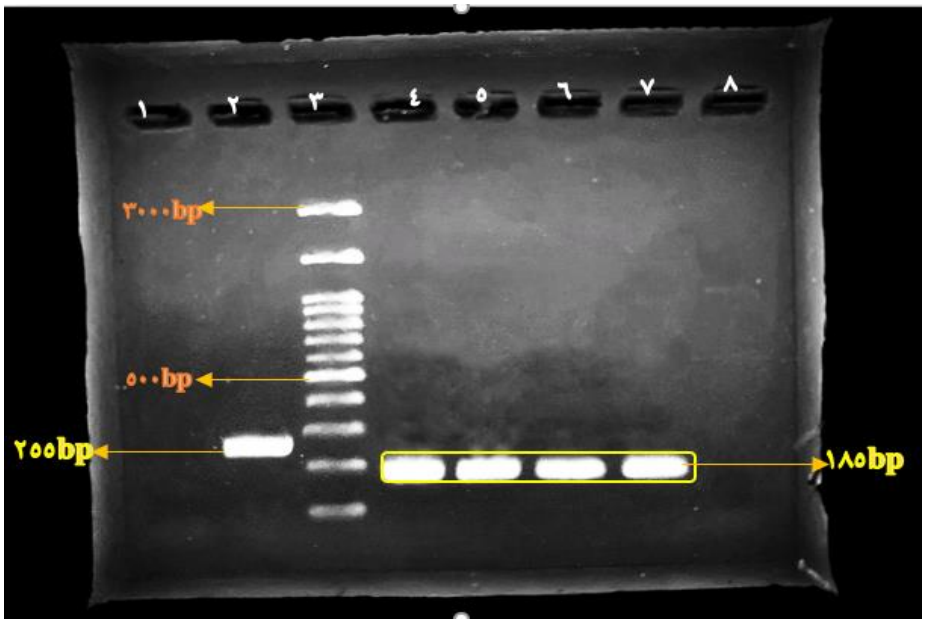
یافته‌ها

نتایج بررسی غلظت و خلوص DNA

نمونه‌های با غلظت DNA بالای ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر و با نسبت ۲۸۰/۲۶۰ چگالی نوری (OD) بین ۱/۸ تا ۲ جهت ادامه کار انتخاب شدند.

نتایج بررسی مولکولی وجود ویروس BLV در نمونه‌ها بر اساس ژن Gag

ابتدا جهت بررسی اینکه نمونه‌های مورد مطالعه مربوط به انسان می‌باشند، تمامی نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH انسانی تکثیر شدند و همگی آنها باند ۲۵۵ bp را نشان دادند. سپس نمونه‌ها با پرایمرهای خارجی ژن Gag تکثیر شدند. محصول PCR نمونه‌های دارای باند ۶۵۰ bp برای تکثیر با پرایمر داخلی استفاده شدند. تعداد ۲۴ نمونه حاوی ژن Gag با پرایمر داخلی باند ۱۸۵ bp را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱- تکثیر ژن Gag در برخی از نمونه‌ها. ستون ۱: کنترل منفی، ستون۲: ژن GAPDH(باند ۲۵۵ bp)، ستون ۳: لدر ۱۰۰bp+۳kb، ستون۴: کنترل مثبت (باندbp ۱۸۵)، ستون ۷-۵: نمونه‌هایGag مثبت (باند ۱۸۵bp)، ستون ۸: کنترل منفی

آنالیز نتایج به‌دست آمده

با توجه به نتایج به‌دست آمده ۸٪ (جدول ۳) از نمونه‌های بافت پارافینه پستان (شامل نمونه‌های بیمار و سالم) و ۱۳٪ (جدول ۴) از نمونه‌های خون (شامل نمونه‌های بیمار و سالم) آلودگی به ژنGag ویروس BLV را نشان دادند که نشان‌دهنده این است که ردیابی این ویروس در نمونه‌های خون بهتر از بافت صورت می‌گیرد.

جدول ۳- توزیع ویروس BLV در نمونه‌های بافت پارافینه **در حالت کلی**

	دسته	تعداد	نسبت مشاهده شده
گروه اول	نمونه‌های بافت پارافینه پستان مبتلا به ویروسBLV	۸	۰/۰۸
گروه دوم	نمونه‌های بافت پارافینه پستان عدم ابتلاء به ویروس BLV	۹۲	۰/۹۲
مجموع		۱۰۰	۱/۰۰

جدول ۴- توزیع ویروس BLV در نمونه‌های خون در حالت کلی

	دسته	تعداد	نسبت مشاهده شده
گروه اول	نمونه‌های خون مبتلا به ویروس BLV	۱۶	۰/۱۳
گروه دوم	نمونه‌های خون عدم ابتلاء به ویروس BLV	۱۰۴	۰/۸۷
مجموع		۱۲۰	۱/۰۰

با توجه به جدول ۵، تفاوت معناداری بین فراوانی ویروس BLV شناسایی شده در بافت پارافینه پستان بدخیم و بافت پارافینه پستان بدون تومور مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). مقایسه ردیابی این ویروس در نمونه‌های خون بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم بیانگر عدم ارتباط ویروس BLV شناسایی شده بین گروه بیمار و سالم در این نمونه‌ها بود ($p>۰/۰۵$) (جدول ۶).

جدول ۵- توزیع ویروس BLV در نمونه‌های بافت بین دو گروه بیمار و سالم

	نمونه +Gag	تعداد نمونه
بافت پارافینه پستان مبتلا به سرطان	۸ (٪۱۶)	۵۰ (٪۱۰۰)
بافت پارافینه پستان سالم	۰ (--)	۵۰ (٪۱۰۰)
سطح معنی‌داری	۰	--

جدول ۶- توزیع ویروس BLV در نمونه‌های خون بین دو گروه بیمار و سالم

	نمونه +Gag	تعداد نمونه
خون افراد مبتلا به سرطان پستان	۱۱ (٪۱۸/۳)	۶۰ (٪۱۰۰)
خون افراد فاقد سرطان پستان	۵ (٪۸/۳)	۶۰ (٪۱۰۰)
سطح معنی‌داری	۰/۱۳۴	--

بحث

امروزه به‌خوبی مشخص شده است که علت سرطان پستان به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارد (۵). ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (HTLV-1) و ویروس لوسمی گاوی (BLV)، ویروس‌های انکوژنیک هستند (۱۱). BLV باعث لوسمی لنفوئیدی مزمن در جانوران متفاوت مانند بز، خرگوش و گاو می‌شود (۲۰). این ویروس در برخی کشورها مانند دانمارک و فنلاند یافت نشده است، ولی در برخی کشورها از جمله کانادا، کلمبیا، چین، ترکیه و ایران مشاهده شده است (۱۹). در ایران ۳۴/۷-۲۲/۱٪ محصولات گاوی، آلودگی با BLV را نشان می‌دهند. روش انتقال این ویروس از گاو به انسان مشخص نیست، ولی احتمالاً محصولات لبنی سنتی و غیرپاستوریزه و گوشت گاو کاملاً ناپخته، راه‌های انتقال می‌باشند (۱۹).

در مطالعه نیکبخت و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی ۴۵۴ نمونه‌های سرمی انسان بدون بیماری خاص با دو روش الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی ضد کپسید[1] و Nested-PCR برای ردیابی ژن Gag صورت گرفت، خطر مواجهه انسان با ویروس لوسمی ثابت شد (۲۰).

در مطالعه بوهرینگ و همکاران (۲۰۰۷) در آمریکا، از ۱۱۰ نفر مبتلا به سرطان پستان، ۶۵ نفر به BLV آلوده بودند، در حالی که تنها ۳۰ مورد از ۱۰۳ مورد زن فاقد این بیماری، این ویروس را در نمونه‌های بافت خود داشتند که این نتیجه، بیانگر ارتباط این ویروس با سرطانی شدن بافت پستان می‌باشد (۹) پس از آن مطالعات متعددی از جمله تحقیق بالتزل و همکاران (۲۰۱۸) در آمریکا بر روی ۲۱۳ نمونه بافت پارافینه پستان صورت گرفت که در ۳۴٪ نمونه‌ها، ژن ویروس BLV مشاهده شد که تأیید کننده ارتباط معنادار بین ویروس BLV و سرطان پستان است (۲۱). در مطالعه دیگر بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی ۹۶ نمونه بافت پستان زن استرالیایی انجام شد، به نتایج ۴۰ مورد

[1] Capsid

نمونه آلوده به این ویروس در بین ۵۰ نمونه مبتلا به سرطان پستان و ۱۹ نمونه آلوده در بین ۴۶ نمونه فاقد این بیماری رسیدند (۲۲). در مطالعه مسا و همکاران (۲۰۱۳) در کشور کلمبیا که بر روی ۱۰۶ نمونه بافت پستان شامل ۵۳ نفر مبتلا به سرطان پستان و ۵۳ نفر سالم انجام شد، وجود ژن BLV Gag در ۳۵/۸٪ از افراد مبتلا و ۴۵/۲٪ از افراد سالم ثابت شد (۱۶). در مطالعه شوینگل و همکاران (۲۰۱۹) در جنوب برزیل که بر روی ۱۴۴ نمونه بافت پارافینه پستان (۷۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۷۲ فرد سالم) انجام شد، وجود این ویروس در ۳۰/۵٪ (۲۲ نفر از ۷۲ نفر) بیماران و ۱۳/۹٪ (۱۰ نفر از ۷۲ نفر) افراد سالم مشاهده شد که بیانگر ارتباط قوی بین حضور این ویروس و سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه است (۲۳). در تحقیق ژانگ و همکاران (۲۰۱۶) در چین که بر روی ۹۱ نمونه بافت سرطانی پستان و ۱۶۰ نمونه خون افراد دارای این سرطان صورت گرفت، بین ویروس BLV و سرطان پستان در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معناداری وجود نداشت (۲۴). بر اساس پژوهش خان و همکاران (۲۰۲۲) در پاکستان که بر روی ۲۷۹۰ بافت پستان پارافینه زن (۲۷۱۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸۰ فرد سالم) صورت گرفت، حضور BLV در ۲۶/۸٪ (۷۲۸ نفر از ۲۷۱۰ نفر) افراد مبتلا به سرطان پستان و ۱۰٪ (۱۰ نفر از ۸۰ نفر) افراد سالم مشاهده شد که نشان‌دهنده احتمال ارتباط بین BLV و سرطان پستان است (۲۵). در تمامی این مطالعات حضور این ویروس در بافت پستان و یا خون انسان گزارش شده است. جهت بررسی وجود این ویروس، معمولاً از نمونه‌های بافت یا خون و از ژن‌های Tax و Gag این ویروس استفاده می‌شود. مطالعه مورد- شاهدی حاضر برای اولین بار به مقایسه بین نمونه‌های بافت و خون جهت بررسی بهتر ژن Gag این ویروس در ایران پرداخت.

مطالعات متعددی به‌منظور ردیابی ویروس BLVبر روی بافت پارافینه پستان صورت گرفته است. در مورد مطالعات انجام شده بر روی بافت پارافینه پستان، می‌توان به مطالعه مسا و همکاران (۲۰۱۳) که به‌منظور ردیابی ژن BLV Gag (۱۶) و بوهرینگ در سال‌های ۲۰۰۷ (۹)، ۲۰۱۴ (۱۷)، ۲۰۱۵ (۲۶)، ۲۰۱۷ (۲۲) اشاره کرد. در مورد ارتباط ویروس BLV و نمونه خون انسان، مطالعات کمتری نسبت به بافت انجام شده است و بیشتر مطالعات بر روی بررسی آنتی‌بادی ضدویروس صورت گرفته است. بوهرینگ و همکاران (۲۰۰۳) در کالیفرنیا تحقیقی به منظور شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن کپسید BLV(p24) توسط تست ایمونوبلاتینگ روی نمونه‌های سرم ۲۵۷ نفر انجام دادند. بعد از کشف ویروس BLV در نمونه‌های سرطانی پستان و ارتباط آن با سرطانی شدن این بافت، نتایج نشان‌دهنده بیماری‌زایی این ویروس در انسان بود (۲۷). بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه بر روی ۹۵ نمونه خون انسان و از طریق بررسی ژنGag به این نتیجه رسیدند که ۳۸٪ از آنها به ویروس BLV آلوده هستند و با توجه به آلودگی سلول‌های خونی انسان به این ویروس، انتقال آن به بافت‌ها و ارگان‌های مختلف بدن وجود دارد (۱۸). همچنین در مطالعه خلیلیان و همکاران (۲۰۱۹) که به‌منظور ردیابی ژن‌های Tax و Gag ویروس BLV، در ۲۰۰ نمونه خون افراد سالم و ۱۷۲ نمونه بافت پارافینه افراد مبتلا به سرطان پستان صورت گرفت، گزارشی مبنی به برتری یک بافت بر دیگری در بررسی این ویروس گزارش نشد (۱۹). در پژوهش حاضر، ۱۰۰ نمونه بافت پارافینه سالم و بیمار و ۱۲۰ نمونه DNA استخراج شده از خون سالم و بیمار مبتلا به سرطان برای ژن Gag ویروس BLV با روش Nested-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. استفاده از روش Nested-PCR، حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به تست‌های سرولوژی دارد. همچنین هزینه کمتر و سادگی بیشتر نسبت به سایر تست‌های مولکولی در کنار دقت بالا و توانایی شناسایی تعداد بارِ ویروسی کم، آن را به یک روش مناسب برای بررسی و تشخیص ویروس‌ها در نمونه‌ها تبدیل کرده است. از این روش آزمایشگاهی در مطالعات بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۹) به‌منظور ردیابی ویروس BLV در نمونه‌های خون انسانی (۱۸) و همچنین تحقیق خان و همکاران (۲۰۲۲) برای شناسایی BLV در نمونه‌های بافت پارافینه پستان استفاده شده است (۲۵). برخلاف مطالعات گذشته که

اکثراً بر روی بافت پارافینه صورت گرفته است (۱۶، ۱۷، ۱۹)، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ردیابی این ویروس در نمونه‌های خون بهتر صورت می‌پذیرد. در مطالعه حاضر، درصد آلودگی نمونه‌های خون با این ویروس ۱۳٪ بود (۱۱ نمونه مثبت از افراد مبتلا به سرطان پستان و ۵ نمونه مثبت از افراد سالم). همچنین درصد آلودگی با ژن Gag این ویروس در نمونه‌های بافت پارافینه پستان ۸٪ (تنها ۸ نمونه از افراد مبتلا به سرطان پستان) بود. هرچند بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، ردیابی این ویروس در نمونه‌های خون بهتر از بافت صورت می‌گیرد، ولی در مقایسه بین نمونه‌های مبتلا به سرطان پستان و نمونه‌های سالم، این ویروس در نمونه‌های بافت پارافینه پستان به‌عنوان فاکتور خطر شناخته شد و بین بیماری سرطان پستان و آلودگی به این ویروس ارتباط معناداری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). با توجه به مطالعه بوهرینگ و همکاران (۲۰۱۹) این امکان وجود دارد که آلودگی به این ویروس از سلول‌های خونی انسان به بافت‌ها و ارگان‌های مختلف بدن منتقل شود (۱۸)، لذا می‌توان گفت احتمال ارتباط بین آلودگی نمونه‌های خون افراد سالم به ویروس BLV و سرطان پستان در آینده وجود دارد.

از محدودیت‌های این مطالعه این بود که با توجه به تشخیص کمیته اخلاق، محقق اجازه دسترسی به اطلاعات بیماران را نداشت و نمونه‌های بافت از بانک بافت بیمارستان‌ها تهیه گردید، لذا تماس جهت دریافت نمونه خون از همان بیماران امکان‌پذیر نبود. از طرف دیگر هدف اصلی این مطالعه، بررسی بافت مناسب‌تر جهت ردیابی ژن Gag ویروس BLV برای مطالعات آینده بود و لزومی به بررسی همزمان ویروس در نمونه‌های خون و بافت یک بیمار وجود نداشت، لذا توصیه می‌شود در مطالعات آتی با توجه به اینکه جمع‌آوری نمونه‌های خون آسان‌تر و همچنین نسبت به بافت یک روش غیرتهاجمی است، از این روش برای ردیابی ویروس BLV استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق، بیانگر ردیابی بهتر ژن Gag ویروس BLV در نمونه‌های خون بود، لذا توصیه می‌شود در مطالعات آتی با توجه به اینکه جمع‌آوری نمونه‌های خون آسان‌تر و همچنین نسبت به بافت یک روش غیرتهاجمی است، از این روش برای ردیابی ویروس BLV استفاده شود. همچنین پیشنهاد می‌شود با توجه به ردیابی این ویروس در هر دو نوع نمونه (خون و بافت پارافینه پستان) و معنادار بودن ارتباط بین آلودگی با این ویروس و ابتلاء به سرطان پستان، در نمونه‌های بافت پارافینه پستان استفاده از شیر پاستوریزه و پاک‌سازی دام‌ها و محصولات لبنی از این ویروس برای بهبود بهداشت عمومی و پیشگیری از خطرات آتی صورت بگیرد.

به‌علاوه بر اساس طیف سنی جمعیت مورد مطالعه، این امکان وجود دارد که به‌علت مخفی شدن ژنوم این ویروس در ژنوم انسانی، افراد سالم دارای این ویروس استعداد بیشتری برای ابتلاء به سرطان پستان در ۲۰-۱۰ سال آینده داشته باشند که پیشنهاد می‌شود در مورد این مطلب در مطالعات آتی بررسی و تحقیق‌های بیشتری انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از پرسنل زحمت‌کش پاتولوژی بیمارستان افضلی‌پور و همچنین باهنر شهر کرمان که ما را در جمع‌آوری نمونه‌های بافت پارافینه پستان یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Hou J, Jiang Y, Tang W, Jia S. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. Exp Ther Med 2013; 5(5):1397-1402.
2. Dastjerdi MN. TP53 codon 72 polymorphism and P53 protein expression in colorectal cancer specimens in Isfahan. Acta medica Iranica 2011: 71-7.
3. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. Public health 2000; 114(2):143-5.
4. Martinez Cuesta L, Lendez PA, Nieto Farias MV, Dolcini GL, Ceriani MC. Can bovine leukemia virus be related to human breast cancer? A review of the evidence. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 2018; 23(3):101-7.
5. Amarante MK, Watanabe MA. The possible involvement of virus in breast cancer. Journal of cancer research and clinical oncology 2009; 135:329-37.
6. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. International journal of cancer 2006; 118(12):3030-44.
7. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, Pelisson I, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. Cancer research 1995; 55(22):5173-9.
8. Kaveh F, Amini K, Sadeh M. Prevalence of Herpes Simplex Virus type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) in the women with breast cancer by Multiplex-PCR method. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2018; 21(3):39-44.
9. Buehring G, Shen HM, Jensen H, Block G. Bovine leukemia virus infection is significantly associated with risk of breast cancer. Cancer Research 2007;67(9_Supplement):1747.
10. Schwartz I, Levy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. Veterinary research 1994; 25(6):521-36.
11. Ashrafi F, Ghezeldasht SA, Ghobadi MZ. Identification of joint gene players implicated in the pathogenesis of HTLV-1 and BLV through a comprehensive system biology analysis. Microbial Pathogenesis 2021; 160:105153.
12. Keikha M, Babaki MK, Fonseca LA, Casseb J. The Relevance of HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis in Iran: A Review Study. Reviews in Clinical Medicine 2019; 6(2).
13. Boostani R, Lotfinejad N, Zemorshidi F, Vahidi Z, Rezaee SA, Farid R, et al. Planning and management to control and eliminate HTLV-1 infection in Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2021; 24(3):264.
14. Hirata M, Shinden Y, Nagata A, Nomoto Y, Saho H, Nakajo A, et al. Clinical features of breast cancer patients with human T-cell lymphotropic virus type-1 infection. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP 2019; 20(6):1909.
15. Zur Hausen H, de Villiers EM. Dairy cattle serum and milk factors contributing to the risk of colon and breast cancers. International journal of cancer 2015; 137(4):959-67.
16. Mesa G, Ulloa JC, Uribe AM, Gutierrez MF. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. Open Journal of Medical Microbiology 2013; 3:84-90.
17. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. Emerging infectious diseases 2014; 20(5):772.
18. Buehring GC, DeLaney A, Shen H, Chu DL, Razavian N, Schwartz DA, et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. BMC infectious diseases 2019; 19(1):1-10.
19. Khalilian M, Hosseini SM, Madadgar O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. Microbial pathogenesis 2019; 135:103566.
20. Nikbakht BG, Rabbani M, Emam M, Rezatofighi E. Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. International Journal of Veterinary Research 2010; 4:253-258
21. Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurthy S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. Cancer 2018; 124(7):1342-9.
22. Buehring GC, Shen H, Schwartz DA, Lawson JS. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. PloS one 2017; 12(6):e0179367.
23. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LM, Frandoloso R, Kreutz LC. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. Scientific reports 2019; 9(1):2949.
24. Zhang R, Jiang J, Sun W, Zhang J, Huang K, Gu X, et al. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. Breast Cancer Research 2016; 18:1-2.
25. Khan Z, Abubakar M, Arshed MJ, Aslam R, Sattar S, Shah NA, et al. Molecular investigation of possible relationships concerning bovine leukemia virus and breast cancer. Scientific Reports 2022; 12(1):4161.
26. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. PloS one 2015; 10(9):e0134304.
27. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. AIDS research and human retroviruses 2003; 19(12):1105-13.