مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۶، شماره۳
مرداد-شهریور۱۴۰۲، صفحه ۴۲۵-۴۱۵

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 66, No.3, P: 415-425
Jul-Sep 2023

مقاله اصلی

شناسایی سیتومگالوویروس (CMV) در نمونه‌های بافتی سرطان معده در مقایسه با گروه‌های غیر بدخیم و شاهد در استان آذربایجان شرقی با روش‌های ایمنوهیستوشیمی‌و PCR

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰

ابوالفضل جعفری ثالث[۱]
افسون شریعت[۲*]
حسین بنازاده باغی[۳]
بهزاد برادران[۴]
بهبود جعفری[۵]

[۱]دانشجوی دکتری تخصصی گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.
[۲] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.
[۳]استادیار گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
[۴]استاد گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران؛
[۵]استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد اهر، اهر، ایران.
نویسنده مسئول: افسون شریعت، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.

Email: afsoonsh1980@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

سرطان معده (GC)، یکی از سرطان‌های شایع دستگاه گوارش می‌باشد که به یک مشکل عمده بهداشتی در سراسر جهان مبدل شده است. در طی سالیان اخیر محققان مختلفی ویروس ها را در پاتوژنز سرطان دخیل نشان داده‌اند. لذا هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی حضور شناسایی سیتومگالوویروس(CMV) در سرطان معده با روش ایمنوهیستوشیمی‌و PCR در بیمارستان‌های سطح استان آذربایجان شرقی می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۵۰ نمونه بافتی سرطان معده از بلوک‌های پارافینی بیمارستانهای سطح استان آذربایجان شرقی همراه با ۵۰ نمونه غیر بدخیم (زخم معده) و ۵۰ نمونه کنترل انتخاب شدند. حضور عفونت ویروسی CMV با روش ایمونوهیستوشیمی‌و PCR انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و آزمون کای اسکوئر استفاده شد.

نتایج

در نمونه‌های بدخیم مورد مطالعه، ۳ نمونه (۶ ٪) با روش ایمونوهیستوشیمی‌حاوی پروتئین pp65 و ۵ نمونه (۱۰ ٪) حاوی CMV DNA بودند. ولی هیچ پروتئین و DNA ویروسی در نمونه‌های غیربدخیم و کنترل مشاهده نشد. نمونه‌های IHC و CMV DNAمثبت به ترتیب دارای میانگین سنی ۱۴/۴۳ ± ۵۸/۳۳ و ۱۲/۵۰ ± ۵۹/۴ بودند. آزمون کای اسکوئر ارتباط معنیداری بین نمونه‌های IHC و DNA CMVمثبت نشان نداد.

نتیجه گیری

در استان آذربایجان شرقی میزان حضور سایتومگالوویروس شیوع پایینی داشته و بیشتر در رده سنی بالای ۵۰ سال و بیشتر در آقایان دیده می‌شود. باتوجه به اینکه حضور CMV با نتایج IHC و DNA CMV مثبت یکسان نبوده بنابراین در این مطالعه روش PCR دقت بالا و کارآمدی بیشتری داشته است.

کلمات کلیدی

سرطان معده، ویروس سایتومگالوویروس، ایمنو هیستوشیمی، PCR

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

سرطان معده گروهی از کارسینومای دستگاه گوارش هستند که سومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان محسوب می‌شود که به یک مشکل بهداشتی در بسیاری از نقاط جهان تبدیل شده است (۱, ۲). این سرطان بیشتر کشورهای در حال توسعه اروپای شرقی، آسیای شرقی و آمریکای جنوبی گزارش شده است که در مرد ها بیشتر از زنها شیوع دارد (۳). در ایران بر خلاف کشورهای غربی و ژاپن میزان بروز سرطان معده در طی دو دهه گذشته روبه افزایش بوده است. این افزایش به خصوص در غرب ایران قابل توجه بوده و به یک معضل و مشکل تبدیل شده است(۴). شیوع سرطان معده یر اساس مناطق جغرافیایی به سه منطقه خطر بالا، خطر پایین و خطر پایین تقسیم بندی می‌شود(۵, ۶). علیرغم اطلاعات کم در مورد پاتوژنز سرطان، اما واضح است که سرطان معده جزو بیماری‌های چند مرحله ای و چند عاملی بوده که به سن، عادات غذایی نادرست، استعمال دخانیات، مصرف الکل، عوامل ژنتیکی و عفونت میکروبی به عنوان مواد سرطان زا بیولوژیکی به طور مستقیم یا غیرمستقیم ، می‌تواند منجر به تومورهای بدخیم متعددی شود(۷, ۸, ۹). شناسایی عوامل عفونی مانند ویروس سایتومگالوویروس به عنوان عوامل مستعد کننده در ایجاد سرطان، نقش احتمالی در مراحل مختلف فرآیند سرطان زایی دارند(۱۰). با توجه به یافته‌های محققان سیتومگالوویروس به عنوان عوامل دخیل در ایجاد کننده سرطان معده معرفی شده اند(۱۱). سیتومگالوویروس (CMV) یکی از اعضای خانواده هرپس ویروس ها بوده و دارای DNA دو رشته‌ای ، دارای قطر ۱۵۰ نانومتر بوده و DNA توسط کپسید ۲۰ وجهی که حاوی ۱۶۲ کپسومر است، پوشیده شده است که باعث عفونت چندین نوع سلول در میزبان انسان می‌شود(۱۲). CMV یک ویروس رایج بوده که فرد پس از آلوده شدن، ویروس را تا آخر عمر حفظ می‌کند. اکثر مردم از وجود سایتومگالوویروس در بدن خود بی اطلاع اند زیرا به ندرت باعث ایجاد مشکل در افراد سالم می‌شود اما عفونت با این ویروس در نوزادان و افرادی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند می‌تواند جدی باشد(۱۳, ۱۴). میزان شیوع CMV از یک کشور به کشور دیگر متفاوت بوده و به سطوح اقتصادی -اجتماعی جمعیت وابسته می‌باشد(۱۵). میزان آلودگی با این ویروس در کشورهای پیشرفته ۴۵درصد و در کشورهای درحال توسعه تا ۱۰۰درصد متغیر است(۱۶). گزارش‌های متعددی حضور CMV را در کولیت اولسراتیو، زخم مری، سرطان روده بزرگ و پروستات نشان دادند. با این حال، ارتباط بین سرطان معده و CMV نامشخص است(۱۷, ۱۸, ۱۹). گلیکوپروتئین B و فسفوپروتئین ۶۵(PP65) موجود در تگومنت سایتومگالو ویروس جزو مهمترین و ایمنی زا ترین آنتی ژنهای ویروس هستند. این آنتی ژن ها توسط سلولهای T +CD4 و T CD8+ شناسایی می‌شوند(۲۰). هدف از این مطالعه بررسی حضور سایتومگالوویروس در نمونه‌های سرطانی، خوش خیم و کنترل در بیمارستانهای استان آذربایجان شرقی با روش ایمنوهیستوشیمی‌و PCR می‌باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه‌های از بیماران

در این مطالعه مقطعی و توصیفی، ۵۰ بلوکه پارافینی سلول سرطانی معده به همراه ۵۰ نمونه غیر بدخیم و کنترل که شامل ۵۰ نمونه زخم معده و ۵۰ نمونه سالم به عنوان کنترل (از نمونه هایی که سرطان و هیپرپلازی خوش خیم نبودند) بود از بیماران بیمارستانهای سطح استان آذربایجان شرقی در بازه زمانی هفت ماهه از آذر ماه ۱۳۹۹ لغایت خرداد ماه ۱۴۰۰ جمع آوری شد. تمامی‌نمونه‌های از

آرشیو مرکز تحقیقات بیمارستانهای سطح استان آذربایجان شرقی بودند که از لحاظ بافت شناسی مورد تایید پاتولوژیست قرار گرفته بودند. بیماران دارای میانگین سنی ۱۲/۰۱ ± ۶۱/۷ سال، از ۳۹ سال تا ۸۱ سال متفاوت بودند. ۶۲ درصد از نمونه ها مرد ۳۸ درصد زن بودند. از معیارهای به این تحقیق، بلوک‌های بیماران مبتلا به سرطان معده و هیپرپلازی خوش خیم معده که تشخیص آنها از نظر پاتولوژی به اثبات رسیده باشد و بلوک پارافینی آنها بافت کافی برای بررسی ایمونوهیستوشیمی‌داشتند و اطلاعات کاملی در مورد سن، جنس، محل زندگی، درجه و مرحله بندی هیستوپاتولوژیکی بود و معیار خروج از مطالعه شامل نمونه‌های فاقد اطلاعات بالینی (یا قابل بررسی نبودن)، بلوک‌های مشکوک به سرطان معده که از نظر پاتولوژیست سرطان در آنها اثبات نشده است، مصرف داروهای ضد ویروسی و نمونه‌های سرطان حاصل از متاستاز سایر ارگانها بود. مطالعه حاضر مطابق با مفاد اعلامیه هلسینکی انجام شده است.

جدول ۱. اطلاعات بالینی و هیستوپاتولوژیک نمونه‌های مورد استفاده در مطالعه

ویژگی ها			مقدار سرطان معده	مقدار هیپرپلازی خوش خیم معده	مقدار کنترل
جنس		مرد	۳۱ (٪ ۶۲)	۳۲ (٪ ۶۴)	۳۰ (٪ ۶۰)
		زن	۱۹ (٪ ۳۸)	۱۸ (٪ ۳۶)	۲۰ (٪ ۴۰)
سن			۶۱/۷ ± ۱۲/۰۱	۵۸/۰۴ ± ۱۳/۴۹	۶۳/۸۸ ± ۱۵/۸۸
محل زندگی		شهری	۳۵ (٪ ۷۰)	۳۴ (٪ ۶۸)	۴۰ (٪ ۸۰)
		روستایی	۱۵ (٪ ۳۰)	۱۶ (٪ ۳۲)	۱۰ (٪ ۲۰)
درجه بندی هیستوپاتولوژیک		G1	۱	–	–
		G2	۱۴	–	–
		G3	۳۵	–	–
مرحله بندی پاتولوژیکی (TNM)	تومور (T)	T1	۳ (٪ ۶)	–	–
		T2	۶ (٪ ۱۲)	–	–
		T3	۲۷ (٪ ۵۴)	–	–
		T4	۱۴ (٪ ۲۸)	–	–
	نود (N)	N0	۴۵ (٪ ۹۰)	–	–
		N1	۵ (٪ ۱۰)	–	–
		N2	۰ (٪ ۰)	–	–
		N3	۰ (٪ ۰)	–	–
	متاستاز (M)	M0	۴۸ (٪ ۹۶)	–	–
		M1	۲ (٪ ۴)	–	–

تهیه نمونه‌ها

با استفاده از دستگاه میکروتوم (Leitz, Germany) سکشن هایی به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرومتر از بلوکه‌های پارافینه جمع کرده و با استفاده از کیت PAKGENE (ساخت کشور ایران) عمل پارافین زدایی انجام شد. جهت پارافین زدایی، ابتدا ۱ ml زایلن به هر ویال حاوی سکشن‌های پارافینه اضافه گردید و سپس در دستگاه ترمومیکسر (Ependorf, Germany) با دمای ۵۹ درجه

سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در دور ۵۰۰ rpm قرار داده و سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلول رویی خارج و مرحله اول دوباره تکرار شد. یک میلی لیتر اتانول۹۶ درصد به هر ویال اضافه و ورتکس انجام شد. سپس سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلول رویی خارج و دوباره این مرحله تکرار شد. سپس ۱۰ الی ۲۰ دقیقه هوادهی انجام شد. بافت‌های به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا انجام فراید استخراج DNA در میکروتیوپ‌های استریل دمای نگهداری شدند.

روش ایمونوهیستوشیمی

نمونه ها با استفاده از محلول پراکسید هیدروژن ۳ ٪ و متانول انکوبه شدند تا باعث سرکوب فعالیت پراکسیداز داخلی شوند. نمونه ها با استفاده از کیت Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB CMV(pp65) 1-L-11 ساخت داکو دانمارک، مورد رنگ آمیزی اختصاصی ایمنوهیستوشیمی‌قرار گرفتند. آنتی بادی منوکلنال و دی آمینوبنزیدین بعنوان ماده کروموژن با تکنیک استرپ آویدین بیوتین پراکسیداز رنگ آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) ، اسلایدها جهت بیان پرتئین ویروسی pp65ارزیابی شدند. هسته سلول‌های سرطانی و گاهی سیتوپلاسم دارای رسوبات رنگی نشان دهنده وجود پروتئین ویروسی می‌باشد. نتایج ایمونوهیستوشیمی‌توسط دو پاتولوژیست ارزیابی شد.

روش PCR

برای استخراجDNA از کیت استخراج پاک ژن و مطـابق با دستورالعمل شرکت سازنده اجرا شد. DNA استخراج شده جهت حضور CMV در ۱۰۰ نمونه بافتی با روش PCR توسط پرایمرهای TCTGCCAGGACATCTTTCTC و GTCACCAAGGCCACGACGTT با اندازه ۱۶۷ جفت باز بررسی شدند. مخلوط واکنش PCR برای انجام واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه تکثیر PCR شامل یک سیکل واسرشت اولیه در دمای ^{o}C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه بود که به دنبال آن ۳۵ سیکل واسرشت در دمای ^{o}C ۹۵ به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ^{o}C ۵۹ به مدت ۴۵ ثانیه، طویل سازی در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۴۰ ثانیه و طویل سازی نهایی در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده گردید. DNA ژنومی‌سرطان معده حاوی توالی CMV به عنوان کنترل مثبت از مرکز تحقیقات ایمونولوژی تبریز تهیه شد. همچنین کنترل منفی شامل مخلوط واکنش PCR بدون DNA الگو (به جای DNA آب مقطر اضافه شد) بود. به منظور سنجش میزان DNA از دستگاه Nanodrop استفاده شد. برای تعیین درجه خلوص DNA از نسبت OD260/280 استفاده شد(اگر این نسبت بین ۱/۸-۱/۹ باشدDNA استخراج شده از خلوص مطلوبی برخوردار است).

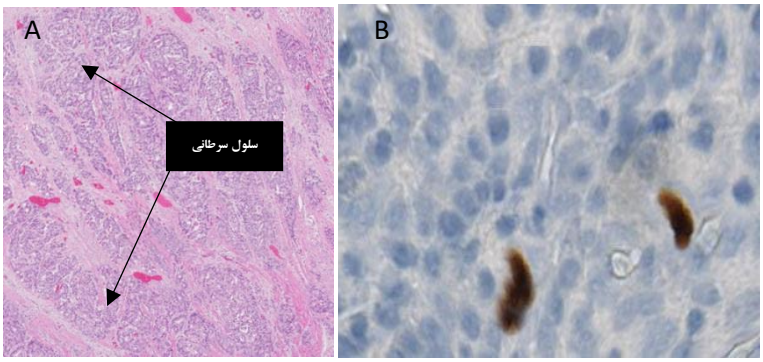
آنالیز آماری

برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. داده ها بر طبق آزمون مجذور کای اسکوئر و شدت همبستگی با آزمون کرامر مورد بررسی قرار گرفت. . P value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

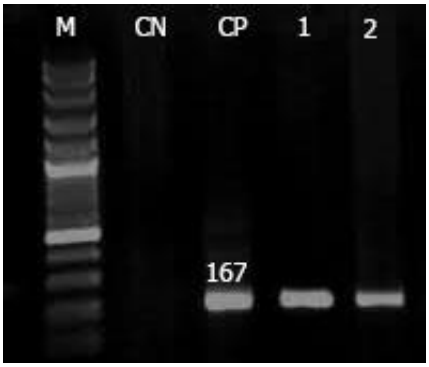
نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از ۵۰ نمونه بافتی مورد مطالعه، ۳ نمونه (۶ ٪) حاوی پروتئین pp65 به صورت رسوبات قهوه ای رنگ بوده اند که با میکروسکوب نوری مشاهده شدند که می‌تواند دلالت بر حضور CMV باشد. نمونه‌های غیر بدخیم و کنترل برای پروتئین ویروسی pp65 منفی بودند(شکل ۱). به منظور تایید روش IHC در

نمونه‌های مورد نظر PCR انجام شد. از ۵۰ نمونه بافت سرطان معده ۵ نمونه (۱۰ ٪) CMV DNA مثبت بوده اند (شکل ۲)، که ۳ نمونه مثبت با روش IHC ، توسط روش PCR نیز مثبت شدند. نمونه‌های غیر بدخیم و کنترل برای CMV DNA منفی بودند.



شکل ۱. شناسایی پروتئین CMV(pp65)در نمونه‌های سرطان معده با روش ایمنوهیستوشیمی، A: سلول سرطانی ، B: سلول سرطانی همراه با رسوبات قهوه ای حاکی از حضور CMV



شکل۲. الکترفورز ژل اگاروز CMV ، M: سایز مارکر، CN: کنترل منفی CP: کنترل مثبت، ۱-۲: نمونه مثبت

نمونه‌های IHC و PCR مثبت به ترتیب دارای میانگین سنی ۱۴/۴۳ ± ۵۸/۳۳ و ۱۲/۵۰ ± ۵۹/۴ ، از ۵۰ سال تا ۷۵ سال بودند(جدول ۱ و ۲). در روش IHC مثبت، ۲ (۶۶/۶۷ ٪)نمونه متعلق به مردان و ۱ (۳۳/۳۳ ٪) نمونه متعلق به زنان و در روش PCR ، ۲ (۴۰ ٪) نمونه متعلق به مردان و ۳ (۶۰ ٪) نمونه متعلق به زنان بودند. اکثر نمونه‌های CMV IHCمثبت دارای گرید ۳ بوده و در مرحله بندی پاتولوژیکی بیشتر نمونه‌های CMV IHC مثبت در مرحله T2/T3/T4 (۳۳/۳۳ ٪) ، N0(۱۰۰ ٪) و M0 (۱۰۰ ٪) بودند. . اکثر نمونه‌های CMV PCR مثبت دارای گرید ۳ بوده و در مرحله بندی پاتولوژیکی بیشتر نمونه‌های CMV PCR مثبت در مرحله T4(۶۰ ٪)، N0(۱۰۰ ٪) و M0(۱۰۰ ٪) بودند.

جدول۱. نتایج CMV(pp65) IHC و نتایج جمعیت شناختی و آسیب شناسی

ویژگی ها			سرطان معده	گروه غیربدخیم	کنترل	P value
جنس		مرد	۲ (٪ ۶۶/۶۷)	-	-	۰/۸۶۴
		زن	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	-	-	
سن			۵۸/۳۳ ± ۱۴/۴۳	-	-	۰/۴۲۷
محل زندگی		شهری	۳ (٪ ۱۰۰)	-	-	۰/۲۴۲
		روستایی	-	-	-	
درجه بندی هیستوپاتولوژیک		G1	-	-	–	
		G2	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	-	–	۰/۹۸۴
		G3	۲ (٪ ۶۶/۶۷)	-	–	
مرحله بندی پاتولوژیکی (TNM)	(تومور، T)	T1	-	-	-	۰/۶۴۰
		T2	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	-	-	
		T3	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	-	-	
		T4	۱ (٪ ۳۳/۳۳)	-	-	
	(نود، N)	N0	۳ (٪ ۱۰۰)	-	-	۰/۵۵۲
		N1	-	-	-	
		N2	-	-	-	
		N3	-	-	-	
	(متاستاز، M)	M0	۳ (٪ ۱۰۰)	-	-	۰/۷۱۵
		M1	-	-	-	

جدول ۲. نتایج CMV PCR و نتایج جمعیت شناختی و آسیب شناسی

ویژگی ها			سرطان معده	گروه غیربدخیم	کنترل	P value
جنس		مرد	۲ (٪ ۴۰)	-	-	۰/۲۸۵
		زن	۳ (٪ ۶۰)	-	-	
سن			۵۹/۴ ± ۱۲/۵۰	-	-	۰/۳۹۹
محل زندگی		شهری	۴ (٪ ۸۰)	-	-	۰/۶۰۷
		روستایی	۱ (٪ ۲۰)	-	-	
درجه بندی هیستوپاتولوژیک		G1	-	-	–	
		G2	۱ (٪ ۲۰)	-	–	۰/۹۲۶
		G3	۴ (٪ ۸۰)	-	–	
مرحله بندی پاتولوژیکی (TNM)	(تومور، T)	T1	-	-	-	۰/۲۷۸
		T2	۱ (٪ ۲۰)	-	-	
		T3	۱ (٪ ۲۰)	-	-	
		T4	۳ (٪ ۶۰)	-	-	
	(نود، N)	N0	۵ (٪ ۱۰۰)	-	-	۰/۴۳۲
		N1	-	-	-	

	N2	-	-	-	
	N3	-	-	-	
M (متاستاز)	M0	۵ (٪ ۱۰۰)	-	-	۰/۶۳۰
	M1	-	-	-	

بین نمونه‌های IHC مثبت و جنس(p =۰/۸۶۴)، سن(p =۰/۴۲۷)، محل زندگی(p = ۰/۲۴۲)، گرید(p =۰/۹۵۱) و T(p = ۰/۶۴) N (p = ۰/۵۵۲) و M (p = ۰/۷۱۵) رابطه ی معنی داری مشاهده نشد. بین نمونه‌های IHC مثبت و PCR مثبت در نمونه‌های CMV رابطه معنی داری وجود نداشت(p>۰/۰۵).

بحث

فاکتورهای مختلفی در سرطان معده موثر میباشد که عواملی همچون عفونت‌های باکتریایی و ویروسی در خطر ابتلا به سرطان نقش دارند (۲۱). امروزه تحقیقات مختلفی نشان دهنده حضور اپشتین بار ویروس در ۹ ٪ از سرطانهای معده می‌باشد، اگرچه تأثیر آن بر سرطان زایی و ایجاد سرطان معده نامشخص است(۲۲, ۲۳). لذا محققان بر این باورند که ممکن است ارتباطی بین عفونت CMV و ایجاد سرطان مشابه آنچه در EBV یافت شده باشد وجود داشته باشد. با این حال ، نقش CMV در سرطان معده هنوز به طور گسترده بررسی نشده است(۲۴). مطالعه حاضر نشان داد از بین ۵۰ نمونه سرطانی مورد بررسی، ۳ نمونه از لحاظ تست‌های IHC و ۵ نمونه از لحاظ تست PCR برای CMV مثبت بودند.Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۷، با بررسی تشخیص سیتومگالوویروس انسانی در سرطان معده با روش ایمنوهیستوشیمی‌و PCR نشان دادند عفونت HCMV در بافتهای بدخیم ممکن است با سرطان زایی یا پیشرفت سرطان معده همراه باشد و احتمالاً مربوط به متاستاز لنفاوی است (۲۴). Goyalو همکاران با بررسی حضور سایتومگالوویروس در بیوپسی‌های مخاطی دستگاه گوارش نشان دادند که CMV در ۹ درصد از بیماران مبتلا به سرطان معده حضور داشتند (۲۵) که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. Chen و همکارانش با بررسی شش بیمار بستری مبتلا به گاستریت تشخیص داده شده بودند، با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی۳ نمونه مثبت CMV جداسازی کردند و نشان دادند که تشخیص سریع منجر به پیش آگهی بهتری برای این بیماران می‌شود(۲۶).Zaruni و همکارانش با بررسی ۹۰ بلوک پارافینی حاصل از بافت‌های GC در کرمان نشان دادند که CMVدر ۷ مورد مثبت تشخیص داده شد که ۶ نمونه متعلق به مردان(۸,۲۲ ٪) و یک نمونه متعلق به زنان (۵,۸۸ ٪) بودند(۲۷). Mohebbi و همکارانش با بررسی ۲۱ نمونه بیوپسی از بیماران مبتلا به سرطان معده نشان دادند که ۷۶,۱۹ درصد از نمونه‌ها دارای ژنوتیپ HCMV بودند(۲۸). که بیشتر از یافته‌های مطالعه حاضر است. Jin و همکارانش با بررسی ارتباط بین CMV و سرطان معده نشان دادند که این ویروس در بافت‌های سرطانی بیشتر از بافت‌های نرمال است. با این حال، هیچ تفاوت قابل توجهی بین CMV و ویژگی‌های آسیب‌شناسی بالینی شناسایی نشد(۲۹).Kim و همکارانش طی بررسی نتایج ازوفاگوگاسترودئودنوسکپی یک مرد ۳۵ ساله که به جز خستگی علائم دیگری نداشت، با سطح آسپارتات ترانس آمیناز و آلانین آمینوترانسفراز بالا و تعدا گلبول‌های سفید ۹,۲۸×۱۰^{۳} مواجه شدند که با بررسی بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی‌عفونت CMV را تایید کردند. لذا زخم معده با عفونت سیتومگالوویروس در بیماران دارای سیستم ایمنی می‌تواند در ارتباط باشد(۳۰). Bernard و همکارانش با بررسی ۱۳ بیمار با میانگین سنی ۸۱ سال گزارش کردند که از این تعداد ۲ نمونه حاوی CMV مثبت بودند. که بیشتر افراد مسن بودند که می‌تواند با پایین بودن سیستم ایمنی در ارتباط

باشد(۳۱). که نزدیک به یافته‌های مطالعه حاضر است. Wong و همکارانش با مشاهده ضایعه بزرگ در معده یک مرد ۶۳ ساله، با انجام مطالعات بافت شناسی نشان دادند که تعداد زیادی CMV در مخاط هیپرپلاستیک معده بدون دیسپلازی مشاهده شد که با درمانهای ضد ویروسی باعث کاهش ضایعه شدند. لذا اهمیت درمان با داروهای ضد ویروسی در مقایسه با جراحی توده روشن می‌شود(۳۲). Harkins و همکارانش با بررسی ۲۹ نمونه از پولیپ ها و آدنوکارسینوم‌های کولورکتال از بیماران مختلف با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی‌نشان دادند که پروتئین‌های HCMV را در حدود ۸۰ درصد پولیپ ها و ۸۵ درصد از آدنوکارسینوم ها حضور دارد. اما در بافت‌های سالم مجاور گزارش نشده نکردند(۳۳). Chen و همکارانش عفونت CMV و هلیکوباکتر پیلوری در تومور معده و بافت‌های اطراف تومور در ۱۳۴ بیمار (۹۸ مرد و ۳۶ زن) با استفاده از PCR مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که در مجموع ۷۴ بیمار (۵۵/۲ ٪) عفونت هلیکوباکتر پیلوری، ۵۸ بیمار (۴۳/۳ ٪) عفونت CMV و ۳۴ نفر (۲۵/۴ ٪) هر دو عفونت CMV و هلیکوباکتر پیلوری داشتند(۳۴). Zhang و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در کشور چین با بررسی تشخیص CMV در سرطان معده و ارتباط احتمالی آن با متاستاز لنفاوی از ۸۰ سرطان معده ۷۶ (۹۵ ٪) نمونه مثبت از لحاظ CMV گزارش کردند(۳۵). تنوع داده ها ممکن است در نتیجه استفاده روشهای مختلف تشخیص CMV ، از جمله روش PCR و ایمنوهیستوشیمی‌باشد. بلکه روشهای مختلف جمع آوری مواد مطالعه و سایتها ، روشهای مختلف محافظت از نمونه در برابر آلودگی ویروسی ، تفاوتهای جغرافیایی و انواع مختلف زیرگروههای انتخاب شده از CMV با خطر بالای سرطان باشد. اگرچه روشPCR جهت تشخیص ژنوم ویروس روشی اختصاصی وحساس می‌باشد، اما مطالعات انجام‌گرفته بر پایه PCR نمیتواند ویروس را در سلول‌های توموری از لنفوسیت‌های اطراف متمایز کند. همچنین PCR برای یافتن ویروس در بافتهای سالم مجاور تومورهای واجد CMV ناتوان است. اما روش ایمنوهیستوشیمی‌می‌تواند پروتئین‌های ویروسی را در سلول‌های بدخیم و غیر بدخیم نشان دهد (۳۶).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با توجه به حضور CMV در نمونه‌های سرطان معده در مقایسه با نمونه‌های غیر بدخیم و کنترل، به نظر می‌رسد که ارتباط معنی داری بین سرطان معده و عفونت CMV در منطقه مورد مطالعه وجود دارد که می‌تواند نقش CMV در پیشرفت و توسعه سرطان معده داشته باشد. بنابراین بررسی سروتایپ‌های CMV در منطقه مورد مطالعه، با روش‌های مختلف تشخیصی ضروری به نظر می‌رسد. زیرا تشخیص زود هنگام باعث پیش آگهی می‌شود.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر مستخرج از پایان نامه دوره دکتری تخصصی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد کازرون می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد کازرون و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مارا یاری کردند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ منافع رقابتی ندارند.

تأیید اخلاقی

این مطالعه توسط دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد کازرون (کد: IR.IAU.KAU.REC.1400.143) تایید شده است. تمام مراحل انجام شده در مطالعات از جمله شرکت کنندگان انسانی مطابق با استانداردهای اخلاقی کمیته تحقیقات سازمانی، ملی و اعلامیه هلسینکی ۱۹۶۴ و اصلاحات بعدی آن قابل مقایسه بود.

References

1. Sexton RE, Al Hallak MN, Diab M, Azmi AS. Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. Cancer and Metastasis Reviews. 2020:1-25.

2. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. Cancer management and research. 2018;10:239.
3. Hamilton SR. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. 2000.
4. Enayatrad M, Salehiniya HJJoMUoMS. Trends in gastric cancer incidence in Iran. 2014;24(114):8-16.
5. Curado M-P, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, et al. Cancer incidence in five continents, Volume IX: IARC Press, International Agency for Research on Cancer; 2007.
6. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. 2009.
7. Camargo MC, Kim W-H, Chiaravalli AM, Kim K-M, Corvalan AH, Matsuo K, et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein–Barr virus positivity: an international pooled analysis. Gut. 2014;63(2):236-43.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011;61(2):69-90.
9. Sekine K, Nagata N. Synchronous gastric cancer presenting different pathological features depending on the involvement of Epstein-Barr virus infection. Clinics and research in hepatology and gastroenterology (Print). 2013;37(2):111-2.
10. Lv Y-l, Han F-f, An Z-l, Jia Y, Xuan L-l, Gong L-l, et al. Cytomegalovirus infection is a risk factor in gastrointestinal cancer: A cross-sectional and meta-analysis study. 2020;63(1-6):10-6.
11. Ueno M, Shimodate Y, Yamamoto S, Yamamoto H, Mizuno MJCjog. Gastric cancer associated with refractory cytomegalovirus gastritis. 2017;10(6):498-502.
12. Krech UJBotWHO. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. 1973;49(1):103.
13. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CAJTPidj. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. 1992;11(2):93-9.
14. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger AJPd. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. 2001;21(5):362-77.
15. van Zuylen WJ, Hamilton ST, Naing Z, Hall B, Shand A, Rawlinson WDJOm. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. 2014;7(4):140-6.
16. Boppana SB, Britt WJJCfmpti. Synopsis of clinical aspects of human cytomegalovirus disease. 2013;2:1-25.
17. Chen H-P, Jiang J-K, Chen C-Y, Chou T-Y, Chen Y-C, Chang Y-T, et al. Human cytomegalovirus preferentially infects the neoplastic epithelium of colorectal cancer: a quantitative and histological analysis. 2012;54(3):240-4.
18. Jang H-J, Kim AS, Hwang J-BJKjop. Cytomegalovirus-associated esophageal ulcer in an immunocompetent infant: When should ganciclovir be administered? 2012;55(12):491.
19. Yi F, Zhao J, Luckheeram RV, Lei Y, Wang C, Huang S, et al. The prevalence and risk factors of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease in Wuhan, Central China. 2013;10(1):1-10.
20. Schulenburg A, Watkins-Riedel T, Greinix H, Rabitsch W, Loidolt H, Keil F, et al. CMV monitoring after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation by pp65 antigen and quantitative PCR. Bone marrow transplantation. 2001;28(8):765-8.
21. Snietura M, Waniczek D, Piglowski W, Kopec A, Nowakowska-Zajdel E, Lorenc Z, et al. Potential role of human papilloma virus in the pathogenesis of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2014;20(21):6632.
22. Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. Journal of the national cancer institute. 2000;92(18):1500-10.
23. Zhu S, Sun P, Zhang Y, Yan L, Luo B. Expression of c-myc and PCNA in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. Experimental and therapeutic medicine. 2013;5(4):1030-4.
24. Zhang L, Guo G, Xu J, Sun X, Chen W, Jin J, et al. Human cytomegalovirus detection in gastric cancer and its possible association with lymphatic metastasis. 2017;88(1):62-8.
25. Goyal G, Zinger T, Warfield D, Cao WJAoP, Medicine L. The Trends of Immunohistochemistry for Tissue-Invasive Cytomegalovirus in Gastrointestinal Mucosal Biopsies: A Large Single Academic Center Study. 2021.
26. Chen D, Zhao R, Cao W, Zhou W, Jiang Y, Zhang S, et al. Clinical characteristics of cytomegalovirus gastritis: A retrospective study from a tertiary medical center. 2020;99(5).
27. Zaruni L, Seyed Alimohammad A, Malekpour R, AghaeiAfshar A, Mollaei HR. Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in gastric cancers in Kerman, Iran. 2016;17(5):2423-8.

28. Mohebbi A, Mamizadeh Z, Bagheri H, Sharifnezhad F, Tabarraei A, Yazdi MJFV. Prevalent latent human cytomegalovirus genotype b2 in biopsy samples of gastric cancer. 2020;15(02):71-8.
29. Jin J, Hu C, Wang P, Chen J, Wu T, Chen W, et al. Latent infection of human cytomegalovirus is associated with the development of gastric cancer. 2014;8(2):898-904.
30. Kim TO, Shim K-N, Kim SY, Lim JY, Choe AR, Tae CH, et al. Gastric Ulcers with Cytomegalovirus Infection in an Immunocompetent Patient. 2019;19(4):277-81.
31. Bernard S, Germi R, Lupo J, Laverrière M-H, Masse V, Morand P, et al. Symptomatic cytomegalovirus gastrointestinal infection with positive quantitative real-time PCR findings in apparently immunocompetent patients: a case series. 2015;21(12):1121. e1-. e7.
32. Wong YJ, Tan BH, Leow WQ, Mesenas SJJPoSH. Cytomegalovirus infection masquerading as gastric carcinoma in an immune-compromised host. 2018;27(1):63-6.
33. Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, et al. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. 2002;360(9345):1557-63.
34. Chen C, Chen S, Han Z, Xie W, Zhang T, Mao C, et al. Patients with Helicobacter pylori-positive gastric cancer with human cytomegalovirus infection have a low tendency of advanced lymphatic metastasis in a Chinese population. Oncology letters. 2021;21(5):1-9.
35. Zhang L, Guo G, Xu J, Sun X, Chen W, Jin J, et al. Human cytomegalovirus detection in gastric cancer and its possible association with lymphatic metastasis. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2017;88(1):62-8.
36. Ahmed RA, Yussif SMJJ. Immunohistochemical detection of human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and human papillomavirus in invasive breast carcinoma in Egyptian women: A tissue microarray study. 2016;6(2):8-16.

Original Article

Detection of Cytomegalovirus in gastric cancer tissue samples compared with non-malignant and control groups in East Azerbaijan province by immunohistochemistry and PCR

Received: 08/05/2023 - Accepted: 21/09/2023

Abolfazl Jafari-Sales[1]
Afsoon Shariat[2*]
Hossein Bannazadeh-Baghi[3]
Behzad Baradaran[4]
Behboud Jafari[5]

[1] PhD student, Department of Microbiology School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Virology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[4]Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[5]Assistant Professor, Department of Microbiology School of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

***Corresponding Author:** Afsoon Shariat, Department of Microbiology School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Email: afsoonsh1980@yahoo.com

Abstract

Introduction

Gastric cancer (GC) is one of the most common gastrointestinal cancers that has become a major health problem worldwide. In recent years, various researchers have shown viruses to be involved in the pathogenesis of cancer. Therefore, the aim of this study was to evaluate the frequency of the presence of cytomegalovirus (CMV) in GC by immunohistochemistry (IHC) and PCR in hospitals in East Azerbaijan province.

Material and Method

In this descriptive cross-sectional study, 50 GC tissue samples were selected from paraffin blocks of hospitals in East Azerbaijan province along with 50 non-malignant samples (gastric ulcer) and 50 control samples. The presence of CMV viral infection was determined by IHC and PCR. SPSS software version 19 and Chi-square test were used to analyze the data.

Results

In the malignant samples studied, 3 samples (6%) were immunohistochemically containing pp65 protein and 5 (10%) samples contained CMV DNA. But no viral protein and DNA were observed in non-malignant and control samples. IHC and CMV positive DNA samples had a mean age of 58.33 ±14.43 and 59.40 ± 12.50, respectively. Chi-square test did not show a significant relationship between IHC and CMV DNA samples.

Conclusion

In East Azerbaijan province, the presence of CMV is low and is more common in men over 50 years and older Considering that the presence of CMV was not the same as the results of IHC and positive CMV DNA, therefore, in this study, the PCR method was more accurate and efficient.

Key words

Gastric cancer, Cytomegalovirus, Immunohistochemistry, PCR

Acknowledgement: There is no conflict of interest