مقاله پژوهشی

بررسی حضور ویروس اپشتین بار در لنفوم هوجکین کودکان ایرانی به روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای EBER

نویسندگان:

لیلا مظفری [۱]، سهراب نجفی پور [۲*]، محمدحسن مشکی باف [۳]، علی مروج [۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران

۳- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 12, No. 2, Summer 2014

چکیده:

مقدمه: ویروس اپشتین بار (EBV)، هرپس ویروسی تومورزا است که به خانواده DNA ویروس‌ها تعلق دارد و لنفوسیت‌های B را در اکثر انسان‌ها عفونی کرده و پایدار باقی می‌ماند. این ویروس با مواردی از لنفوم هوجکین (HL) در ارتباط می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی میزان حضور ویروس اپشتین بار در نمونه‌های لنفوم هوجکین کودکان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۱۶ نمونه بافتی لنفوم هوجکین به شکل بلوک‌های پارافینه ثابت‌شده در فرمالین از بایگانی بخش آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهرستان فسا جمع‌آوری شد. حضور رونوشت‌های RNA کد شده توسط ویروس با روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای (EBER EBER-ISH) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: محدوده سنی ۱۶ نمونه پارافینه ثابت‌شده در فرمالین بیماران هوجکین به روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای EBERs، ۱۲-۴ سال (با میانگین سنی ۸ سال) بود. ویروس اپشتین بار در ۱۲ نمونه (۷۵٪) شامل ۹ نمونه مذکر و ۳ نمونه مؤنث، در زیر تایپ‌های مختلف لنفوم هوجکین وجود داشت. ۸۰٪ از زیر تایپ‌های میکس سلولاریتی (Mixed cellularity)، ۶۷٪ نودولار اسکلروزیس (Nodular sclerosis) و ۱۰۰٪ لنفوسیت پرودامیننت (Lymphocyte predominance) مثبت شدند. حضور ویروس اپشتین بار در گروه‌های سنی ۷-۴ سال و ۱۲-۸ سال به ترتیب ۷۱/۵٪ و ۷۷/۸٪ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بیانگر وجود ارتباطی قوی بین ویروس اپشتین بار و لنفوم هوجکین در کودکان می‌باشد. ارتباط لنفوم هوجکین و ویروس اپشتین بار در کودکان ایرانی دارای الگوی مشابهی با دیگر کشورهای در حال توسعه است.

کلید واژگان: ویروس اپشتین بار، لنفوم هوجکین، هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای EBER,

Par J Med Sci 2014;12(2):57-63

مقدمه:

لنفوم هوجکین برای اولین بار توسط توماس هوجکین در سال ۱۸۳۲ شرح داده شد [۱]. این لنفوم یک نئوپلاسم بدخیم مرتبط با سلول‌های B می‌باشد که از نظر پاتولوژی، بر طبق تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت، دو تایپ اصلی برای آن در نظر گرفته‌شده است که شامل لنفوم هوجکین کلاسیک و لنفوم هوجکین غیر کلاسیک می‌باشد. این دو نوع بر اساس تفاوت‌های مورفولوژیکی، فنوتیپی، مشخصات مولکولی و کلینیکی از یکدیگر متمایز شده‌اند. لنفوسیت پرودامیننت نشان‌دهنده لنفوم هوجکین غیر کلاسیک و میکس سلولاریتی، نودولاراسکلروزیس، لنفوسیت دپلیتد (Lymphocyte Depleted) و لنفوسیت ریچ (Lymphocyte Rich) نشان‌دهنده لنفوم هوجکین کلاسیک می‌باشند [۲]. اگرچه علت بیماری‌زایی لنفوم

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، فارس، ایران

تلفن تماس : ۰۹۱۷۷۰۱۷۱۷۴ پست الکترونیک: sohrabnajafipour@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۷/۲۲ اصلاح: ۹۲/۱۱/۲۱ پذیرش: ۹۳/۳/۵

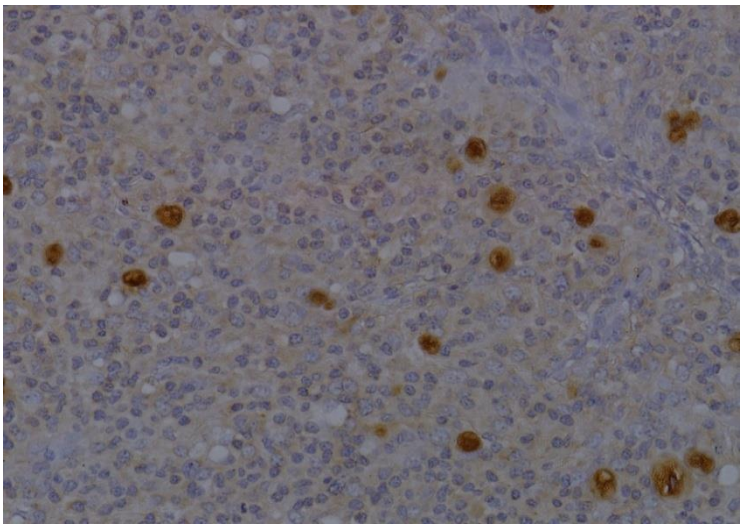
هوجکین هنوز ناشناخته است، ولی تعدادی از مطالعات انجام‌گرفته، استعداد ژنتیکی افراد را در ارتباط با ابتلا به بیماری نشان داده‌اند. همچنین ارتباطی بین لنفوم هوجکین و آنتی‌ژن‌های خاص HLA انسانی گزارش‌شده است [۳]. تحلیل پلی مورفیسم های HLA کلاس I نشان می‌دهد که نقص در عرضه آنتی‌ژن با خطر ابتلا به لنفوم هوجکین EBV مثبت در ارتباط می‌باشد [۴]. مطالعات سرولوژیکی در سال ۱۹۷۰ نشان داد که عفونت با ویروس اپشتین بار ارتباط قوی با لنفوم هوجکین داشته و پس از آن با استفاده از روش ساترن بلات حضور این ویروس در نمونه‌های لنفوم هوجکین تشخیص داده شد [۵]. عفونت با ویروس اپشتین بار از طریق تماس با ترشحات بزاق فرد آلوده به دیگر افراد انتقال می‌یابد. سیر عفونت به وضعیت اجتماعی- اقتصادی، عوامل ژنتیکی، منطقه جغرافیایی و سن فرد در زمان اولین تماس با ویروس بستگی دارد [۶-۷]. بررسی‌های سرواپیدمیولوژیکی در مقیاس جهانی بیانگر انتشار گسترده ویروس اپشتین بار در مناطق مختلف جغرافیایی دنیا است. یافته‌ها نشان می‌دهد که در کشورهای در حال توسعه اکثر کودکان تا سنین ۶ سالگی به ویروس اپشتین بار آلوده می‌شوند و دارای تیتر آنتی‌بادی علیه آن می‌باشند، درحالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته بیش از ۵۰٪ افراد تا سن بلوغ نسبت به این ویروس حساس باقی می‌مانند. عفونت اولیه با این ویروس در کودکان اغلب پنهان و بدون علائم بالینی یا دارای علائم غیراختصاصی می‌باشد، اما در ۷۵- ۳۵٪ نوجوانان و بالغین جوان این ویروس ایجاد منونوکلئوز عفونی می‌کند [۸]. مطالعات نشان داده است که ویروس اپشتین بار تقریباً با یک‌سوم لنفوم هوجکین در کشورهای توسعه‌یافته مرتبط است، درحالی‌که میزان بالاتری از ارتباط با این ویروس در کشورهای در حال توسعه گزارش‌شده است. ویروس اپشتین بار در این کشورها اغلب با لنفوم هوجکین از نوع میکس سلولاریتی نسبت به نوع نودولار اسکلروزیس مرتبط می‌باشد و در کودکان و افراد مسن متداول‌تر است [۹]. در مطالعه انجام‌شده توسط آل‌بویه و همکاران در سال ۱۳۷۳، میزان حضور ویروس اپشتین بار روی ۱۳۹ نمونه‌ی لنفوم هوجکین کودکان ایرانی ۷۳٪ گزارش شد [۱۰]. نجفی پور و همکاران در سال ۱۳۸۲ با مطالعه روی ۵۵ نمونه لنفوم هوجکین به روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای، حضور ویروس اپشتین بار در بیماران هوجکین را حدود ۷۳٪ [۱۱] و کاتبی و همکاران بامطالعه روی ۳۰ مورد لنفوم هوجکین به روش ایمنوهیستوشیمی در سال ۱۳۸۸، حضور این ویروس را ۹۳٪ گزارش کرده‌اند [۱۲]. در مطالعه دیگری که توسط جدلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی ۳۶ نمونه لنفوم هوجکین کودکان ایرانی توسط دو روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای و ایمنوهیستوشیمی انجام شد، حضور ویروس اپشتین بار به ترتیب ۴۴٪ و ۵۸٪ گزارش‌شده است [۱۳].

ویروس اپشتین بار به‌شدت سلول‌های سرطانی هوجکین- ریداشتنبرگ (HRS) را ترانسفورم کرده و در این سلول‌ها انواع مختلفی از پروتئین‌های نهفته شامل شش آنتی‌ژن هسته‌ای (EBNA-۳،۲،۱A،۳B،۳C،EBNA-LP)، سه پروتئین نهفته غشایی (LMP -۱،LMP-۲A،LMP-۲B) و دو RNA ی غیرقابل ترجمه (EBER-۱،EBER-۲) را بیان می‌کند [۱۴]. روش‌های گوناگونی برای شناسایی ویروس اپشتین بار در سلول‌های سرطانی وجود دارد که روش اختصاصی و حساس هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای (in situ hybridization) نسبت به سایر روش‌ها برتری داشته و قادر است محصولات ژنی نهفته ویروس (EBERs) را در سلول‌های بدخیم ریداشتنبرگ شناسایی کند. ازآنجایی‌که رونوشت‌های EBERs به تعداد زیادی در حدود ۱ میلیون کپی بیان می‌شوند این روش بسیار حساس و دقیق می‌باشد [۱۵]. هدف کلی از تحقیق حاضر، بررسی حضور ویروس اپشتین بار در نمونه‌های لنفوم هوجکین کودکان با استفاده از روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

در این پژوهش که به مدت شش ماه در سال ۱۳۹۱ انجام شد، تعداد ۲۴ نمونه بافتی لنفوم هوجکین به‌صورت بلوک‌های پارافینه ثابت‌شده در فرمالین از بایگانی بخش آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی واحد فسا مورد استفاده قرار گرفت. پس از بازبینی نمونه‌ها توسط پاتولوژیست، تعداد ۱۶ نمونه بافتی که لنفوم هوجکین آن‌ها تائید شده بود برای این پژوهش انتخاب و بقیه به دلایل در دسترس نبودن اطلاعات فرد بیمار و نبود بافت کافی از مطالعه کنار گذاشته شدند. دامنه سنی بیماران مورد بررسی ۱۲-۴ سال بود. از بین ۱۶ مورد لنفوم هوجکین، ۱۲ مورد مذکر (۷۵٪) و ۴ مورد مؤنث (۲۵٪) بودند. از بلوک‌های پارافینه، اسلایدهایی برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) تهیه شد. با این رنگ‌آمیزی می‌توان لنفوم هوجکین و زیر تایپ‌های هیستولوژیکی آن را تائید کرد. برای تهیه اسلاید از نمونه‌های بافتی پارافینه ابتدا با دستگاه میکروتوم، برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر جدا و روی اسلایدهای پوشش‌دار قرار داده شدند. پس از یک ساعت قرار گرفتن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، اسلایدها در محلول‌های زایلن و الکل اتانول پارافین زدایی و آبگیری شده و با آب جاری شستشو داده شدند. سپس اسلایدها رنگ‌آمیزی و توسط پاتولوژیست برای تعیین لنفوم هوجکین و زیر تایپ‌های آن زیر میکروسکوپ بررسی شدند.

هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای با استفاده از پروب های الیگونوکلئوتیدی نشان‌دار شده با فلورسین-(Novacastra, NCL-EBV-K) کد RNA (EBERs) انجام گرفت که با رونوشت‌های شده توسط ویروس اپشتین بار هیبرید تشکیل می‌دهند. در این روش، اسلایدها به مدت ۳ دقیقه در محلول‌های زایلن و الکل اتانول ۹۹٪V/V و ۹۵٪ به ترتیب پارافین زدایی و آبدهی شدند. سپس با استفاده از قلم داکو (Dako Denmark A/S - آلمان) حدود بافت مشخص و با سمپلر ۱۰۰ میکرو لیتر، محلول پروتئیناز K رقیق‌شده در بافر تریس به بافت‌ها اضافه شد. اسلایدها در اتاقک مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، اسلایدها در آب بدون یون به مدت ۳ دقیقه شسته و در اتانول V/V ۹۵٪ و ۹۹٪ آبگیری شدند. در مرحله هیبریدیزاسیون، ۲۰ میکرو لیتر محلول هیبریدیزاسیون پروب (NCL-EBV probe– شرکت Leica انگلیس) به بافت‌ها اضافه شد و اسلایدها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، اسلایدها در TBS حاوی ۱۰۰-x Triton V/V ۰/۱٪ به مدت ۳ دقیقه شسته شدند. در مرحله تشخیص، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول بلوک کننده (سرم خرگوش رقیق‌شده در ۱۰۰ V/V Triton x-۰/۱٪ و TBS, ۳٪W/V BSA) به بافت‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول بلوک کننده روی بافت‌ها بیرون ریخته شد و (rabbit f[ab] anti-Vial A (FITC/AP با رقت ۱ به ۱۸۰ در محلول رقیق‌کننده (TBS, ۳٪BSA W/V و ۰/۱٪ V/V Triton x-۱۰۰) به اسلایدها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد، اسلایدها ابتدا در TBS و پس از آن در بافر سوبسترای آلکالین فسفاتاز شستشو شدند. اسلایدها تمام طول شب با محلول حاوی آنزیم سوبسترا (Vial B) که با رقت ۱ به ۵۰ در بافر سوبسترای آلکالین فسفاتاز تهیه شده و ۱ میکرو لیتر مهارکننده Levamisol hydrochloride نیز به آن اضافه‌شده بود، پوشانده و در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از انکوباسیون به مدت یک‌شب، اسلایدها با آب شستشو و با هماتوکسیلین مایر رنگ‌آمیزی شدند. سپس اسلایدها نصب و توسط پاتولوژیست زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. موارد مثبت معمولاً به‌صورت سلول‌های سرطانی دو هسته‌ای قهوه‌ای‌رنگ بودند (شکل ۱).



شکل ۱: هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای EBERs در نمونه‌های لنفوم هوجکین

داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری spss 16 و با استفاده از آزمون دقیق فیشر تحلیل شدند. سطح معناداری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج:

در این مطالعه، تعداد ۱۶ کودک مبتلا به لنفوم هوجکین در محدوده سنی ۱۲–۴ سال و میانگین سنی ۸ سال مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ۱۲ بیمار مذکر (۷۵٪) و ۴ بیمار مؤنث (۲۵٪) بودند. بیماران از نظر گروه سنی به دو دسته کودکان بین ۷–۴ سال (۴۳/۷۵٪) و کودکان بین ۱۲–۸ سال (۵۶/۲۵٪) تقسیم شدند. از لحاظ بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی، ۵ بیمار (۳۱/۲۵٪) در زیر تایپ میکس سلولاریتی، ۹ بیمار (۵۶/۲۵٪) در زیر تایپ نودولار اسکلروزیس و ۲ بیمار (۱۲/۵٪) در زیر تایپ لنفوسیت پرودامیننت قرار داشتند. نتایج بررسی

حضور ویروس اپشتین بار در نمونه‌های لنفوم هوجکین به روش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. با این روش، حضور ویروس در سلول‌های سرطانی ریداشتنبرگ ۷۵٪ (۱۲ مورد مثبت از ۱۶ مورد کل) شناسایی شد. بر اساس جنسیت، میزان حضور ویروس اپشتین بار در مذکرها ۷۵٪ (۹ مورد مثبت از ۱۲ مورد) و در مؤنث‌ها ۷۵٪ (۳ مورد مثبت از ۴ مورد) به دست آمد. ارتباط بین نتایج آزمایش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای در دو گروه لنفوم هوجکین کودکان مؤنث و مذکر به‌وسیله آزمون دقیق فیشر بررسی شد و تحلیل آماری تفاوت معناداری بین دو جنس نشان نداد (p-value: ۱/۰۰۰). میزان حضور ویروس اپشتین بار در زیر تایپ‌های هیستولوژیکی لنفوم هوجکین به ترتیب ۸۰٪ در زیر تایپ میکس سلولاریتی (۴ مورد مثبت از ۵ مورد کل)، ۶۷٪ زیر تایپ نودولار اسکلروزیس (۶ مورد مثبت از ۹ مورد کل) و ۱۰۰٪ زیر تایپ لنفوسیت پرودامیننت (۲ مورد مثبت از ۲ مورد کل) تعیین شد. مقایسه نتایج آزمایش هیبریدیزاسیون ناحیه‌ای در این زیر تایپ‌ها با آزمون دقیق فیشر هیچ‌گونه تفاوت معناداری بین زیر تایپ‌ها نشان نداد (p-value: ۰/۸۲۶). همچنین در مطالعه حاضر، میزان حضور ویروس در زیر تایپ میکس سلولاریتی نسبت به نودولار اسکلروزیس شایع‌تر بود. به‌علاوه، موارد EBV مثبت در گروه سنی ۷-۴ سال ۷۱/۵٪ و در گروه سنی ۱۲-۸ سال ۷۷/۸٪ بود که بر اساس آزمون آماری دقیق فیشر تفاوت معناداری بین این دو گروه سنی مشاهده نشد (p-value: ۱/۰۰۰) (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی لنفوم هوجکین EBV مثبت بر اساس جنسیت و سن

	EBV+ % [EBER-ISH]	نمونه های لنفوم هوجکین [٪]
جنسیت بیماران		
مذکر	۹ [٪۷۵]	۱۲ [٪۷۵]
مونث	۳ [٪۷۵]	۴ [٪۲۵]
سن بیماران		
۷-۴ سال	۵ [٪۷۲]	۷ [٪۴۴]
۱۲-۸ سال	۷ [٪۷۸]	۹ [٪۵۶]
جمع	۱۲ [٪۷۵]	۱۶ [٪۱۰۰]

جدول ۲: فراوانی لنفوم هوجکین EBV مثبت بر اساس زیر تایپ های هیستولوژیکی مختلف

زیر تایپ های هیستولوژیکی	EBV+ % [EBER-ISH]	نمونه های لنفوم هوجکین [٪]
میکس سلولاریتی	۴ [٪۸۰]	۵ [٪۳۱]
نودولار اسکلروزیس	۶ [٪۶۷]	۹ [٪۵۶]
لنفوسیت پرودامیننت	۲ [٪۱۰۰]	۲ [٪۱۳]
جمع	۱۲ [٪۷۵]	۱۶ [۱۰۰]

بحث:

لنفوم هوجکین در سراسر دنیا اتفاق می‌افتد و دارای اپیدمیولوژی پیچیده‌ای است که احتمالاً بیانگر اتیولوژی چندعاملی نظیر برهمکنش بین عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد [۱۶-۱۷]. سهم ویروس اپشتین بار در اتیولوژی لنفوم هوجکین بر اساس گروه‌های سنی و منطقه جغرافیایی متفاوت است، به‌طوری‌که سن افراد در زمان عفونت اولیه با این ویروس به همراه زمینه‌های ژنتیکی از عوامل مهمی در ایجاد تظاهرات بالینی عفونت به‌حساب می‌آیند [۱۷]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که لنفوم هوجکین در کودکان ایرانی با عفونت ویروس اپشتین بار در سلول‌های بدخیم هوجکین-ریداشتنبرگ ارتباط دارد. اغلب مطالعات انجام‌شده روی لنفوم هوجکین تفاوت‌های اپیدمیولوژیکی را بین کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مطالعات انجام‌شده، توزیع سنی این لنفوم در کشورهای توسعه‌یافته از یک الگوی دوکوهانه پیروی می‌کند که دارای دو پیک سنی ۳۵-۱۵ سال و بالای ۵۰ سال است [۱۸-۱۹]. درحالی‌که در کشورهای در حال توسعه این دو پیک سنی در کودکان زیر ۱۵ سال و افراد بالای ۵۰ سال مشاهده می‌شود [۱۷-۲۰]. عفونت ویروس اپشتین بار در تمام جوامع انسانی دیده می‌شود، اما سن ابتلا به عفونت اولیه در جوامع فقیر و پرجمعیت پایین می‌باشد، به‌طوری‌که در نواحی آفریقا، جنوب شرق آسیا و آمریکای لاتین معمولاً بیماری هوجکین در اوایل دوران کودکی (قبل از سن ۵ سالگی) رخ می‌دهد، ولی در کشورهای توسعه‌یافته سن مبتلا شدن به عفونت اولیه بالاتر بوده و منونوکلئوز عفونی در جوانان بیش‌تر

دیده می‌شود [۲۱]. علاوه بر این، وجود یک عامل زمینه‌ای سرکوب سیستم ایمنی به‌عنوان دلیلی برای شیوع بالای موارد لنفوم هوجکین EBV مثبت در کشورهای در حال توسعه نشان داده‌شده است. عفونت‌های گوناگون ازجمله عفونت با ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی و سوءتغذیه برخی از علل احتمالی سرکوب سیستم ایمنی در این کشورها می‌باشند [۲۲]. در کشورهای در حال توسعه به‌طورمعمول عفونت اولیه در کودکی رخ می‌دهد و لنفوم هوجکین با ویروس اپشتین بار مرتبط بوده و زیر تایپ میکس سلولاریتی در این کشورها شایع‌تر می‌باشد. درحالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته و صنعتی، لنفوم هوجکین در جوانان دارای شیوع بیش‌تری است و زیر تایپ نودولار اسکلروزیس غالب می‌باشد [۱۹–۲۳]. توده‌های توموری لنفوم هوجکین از حدود ۲٪ سلول‌های بدخیم هوجکین–ریداشتنبرگ و ۹۸٪ سلول‌های غیر سرطانی ارتشاحی تشکیل‌شده است [۲۴]. تحقیقات متعددی در زمینه تعیین رابطه و حضور ویروس اپشتین بار با سرطان‌های مختلف مانند لنفوم بورکیت، لنفوم سلول‌های B در بیماران ایدزی و پیوندی، کارسینومای نازوفارنکس و لنفوم هوجکین در سرتاسر دنیا در حال انجام می‌باشد. در ایران نیز چندین تحقیق در مورد حضور و رابطه این ویروس با لنفوم هوجکین صورت گرفته است. گسترش این تحقیقات باعث پدیدار شدن تصویر کاملی از وضعیت ارتباطی لنفوم هوجکین و ویروس اپشتین بار در مناطق مختلف جغرافیایی و گروه‌های مختلف سنی خواهد شد.

این مطالعه که با استفاده از ۱۶ نمونه پارافینه از کودکان مبتلا به لنفوم هوجکین در دانشگاه علوم پزشکی شهرستان فسا انجام‌گرفته است با محدودیت‌هایی ازجمله کیفیت نامناسب برخی از نمونه‌های پارافینه و عدم همکاری گروه‌های آسیب‌شناسی برای استفاده از نمونه‌ها همراه بوده است. ویروس اپشتین بار در ۱۲ مورد از ۱۶ مورد کل لنفوم هوجکین کودکان بین سنین ۱۲–۴ سال مشاهده شد و این لنفوم در مطالعه حاضر ارتباط قوی (۷۵٪) با ویروس اپشتین بار داشت که تقریباً با سایر مطالعات قبلی انجام‌شده بر روی کودکان در دیگر کشورهای در حال توسعه نظیر پرو (۹۹٪)، جنوب آفریقا (۶۸٪)، چین (۷۲٪)، هند (۹۶٪)، مالزی (۹۳٪)، تایلند (۹۲/۸٪)، اردن (۴۷٪) و کویت (۷۹٪) مطابقت دارد [۲۰، ۲۵–۲۶]. شیوع لنفوم هوجکین در مذکرها بیش‌تر از مؤنث‌ها گزارش‌شده است که این تفاوت با وجود معنادار نبودن آماری هم‌خوانی بامطالعه حاضر دارد [۱۱،۲۷،۲۸،۲۹،۳۰،۳۱،۳۲]. دلیل معنادار نبودن این تفاوت می‌تواند ناشی از کم بودن تعداد نمونه‌ها در تحقیق حاضر باشد. در این مطالعه، همچنین تحلیل نتایج زیر تایپ‌های مختلف لنفوم هوجکین نشان داد که حضور ویروس اپشتین بار در زیر تایپ میکس سلولاریتی نسبت به زیر تایپ نودولار اسکلروزیس بالاتر می‌باشد که با دیگر مطالعات انجام‌شده در کشورهای در حال توسعه مطابقت دارد [۱۱،۲۶،۲۷،۲۹،۳۲،۳۳]. در کشورهای در حال توسعه اولین بروز سنی لنفوم هوجکین در سنین ۷ تا ۱۲ سالگی رخ می‌دهد، درحالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته شیوع اولیه با تأخیر در اوایل بلوغ یا بزرگ‌سالی اتفاق می‌افتد. گزارش‌های زیادی مبنی بر نقش ویروس اپشتین بار در درصد بالایی (گاهی تا صد در صد) از نمونه‌های لنفوم هوجکین به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه ارائه‌شده است. علاوه بر آن، عوامل متعددی ازجمله شرایط ژنتیکی یا محیطی، موقعیت‌های جغرافیایی و اقتصادی در ایجاد بیماری دخالت دارند. در این مطالعه نیز مشابه مطالعات قبلی، شیوع لنفوم هوجکین کودکان در هر دو گروه سنی ۷–۴ سال و ۱۲–۸ سال مشاهده شد و تا حدودی در گروه سنی ۱۲–۸ سال بیش‌تر بود [۳۲–۳۴]. در مقایسه با سایر مطالعات مشابه انجام‌گرفته، معنادار نبودن تفاوت‌ها در بخش‌هایی از مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی باشد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، میزان شیوع ویروس اپشتین بار با نمونه‌های لنفوم هوجکین در کودکان زیر ۱۴ سال ۷۵٪ بود که بیانگر ارتباط قوی بین ویروس اپشتین بار با لنفوم هوجکین در کودکان ایرانی و مشابه با سایر کشورهای در حال توسعه می‌باشد.

References:

1.Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. Med Chir Trans 1832; 17:69-97.
2.Stein H, Delsol G, Pileri S, et al. Hodgkin Lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stain H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer. France: Lyon, IARC Press.; 2001 : 237-253.
3.Kaufman D, Longo L. Hodgkin’s disease. In: E.Lenhord R, T.Osteen R, Gansler T. Clinical oncology. 2nd ed. United states of America: Churchill livingstone; 2000 Chapter 90: 2620- 2648.
4.Diepstra A, Niens M, Vellenga E, et al. Association with HLA class I in Epstein-Barrvirus- positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virusnegative Hodgkin's lymphoma. Lancet 2005; 365(9478):2216-2224.

5.Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. Hum Pathol 2007; 38:1293-1304.
6.Maeda E, Akahane M, Kiryu S, et al. Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. Jpn J Radiol 2009; 27:4-19.
7.Talaro KP, Talaro A. Foundations in microbiology. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2002.
8. Modarres Sh, Modarres Sh. A survey of Epstein-Barr virus (EBV) infection in children and adults in Tehran. Iranian Journal of Public Health. 2000; 29(1-4):53-60. (Persian)
9.Mohammed S. Saeed. Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma - immunohistochemical case series study. Ann Coll Med Mosul. 2009; 35(2):93-103.
10. Alebouyeh M, Vossough P. Hodgkin disease in Iranian children. Eur J Pediatr 1993; 152(1):21-3. (Persian)
11. Najafipour S, Mokhtari Azad T, Kousari F,et al. Association of Epstein-Barr Virus and Hodgkin's Disease. Acta Medica Iranica 2003;41(1):1-10.
12. Katebi M, Sharifi N, Tarhini M, et al. Frequency of Epstein-Barr virus expression in various histological subtypes of Hodgkin's lymphoma. Histo pathol 2008; 52:775-776. (Persian)
13. Jadali F, Karimi A, Fallah F, Habibi G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in Pediatric Hodgkin's Lymphoma in Iran by immunohistochemistry and in situ hybridization. Cancer Ther 2008; 6:665-672. (Persian)
14. Young LS, Murray P G. Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene 2003; 22:5108-5121.
15. Wu TC, Mann RB, Charache P, et al. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Int J Cancer 1990; 46:801-804.
16. Nakatsuka S, Aozasa K. Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. Int J Hematol. 2006; 83(5):391-397.
17. Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin Lymphoma. Medit J Hemat Infect Dis, 2009;1(2): 013.
18. MacMahn B. Epidemiology of Hodgkin's disease. Cancer Res 1966; 26:1189-200.
19. Almars NM. Hodgkin's lymphoma in North Jordan. Saudi Med J 2004; 25:1917-1921.
20. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, et al. Epstein-Barr Virus (EBV) in Chinese Pediatric Hodgkin Disease. Cancer 2001; 92:1621-1631.
21. Figueira-Silva CM, Pereira FE. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, state of Espirito santo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop2004; 37(5):409-412.
22. Adelusola KA, Titiloye NA, Rotimi O, et al. Epstein Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin's lymphoma in Nigerians. Afr Health Sci 2009; 9(3):174-178.
23. Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. J Intern Med 2008; 264(6):537-548.
24. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994; 84(5):1361-1392.
25. Staratschek-Jox A, Sascha Kotkowski S, Belge G, et al. Detection of Epstein- Barr Virus in Hodgkin-Reed-Sternberg Cells. Am J Pathol 2000; 156:209-216.
26. Dinand V, Dawar R, Arya LS, et al. Hodgkin's lymphoma in Indian children, prevalence and significance of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. Eur J ancer 2007; 43:161-168.
27. Makar RR, Saji T, Junaid TA. Epstein-Barr Virus Expression in Hodgkin's Lymphoma in Kuwait. Pathol Oncol Res 2003; 9(3):159-165.
28. Azzam SA. High Incidence of Hodgkin's disease in children in Lebanon. Cancer Res 1966; 26:1202-1203.
29. Gad-El-Mawla N, El-Deeb BB, Abu-Gabal A, et al. Pediatric Hodgkin's Disease in Egypt. Cancer 1983; 52: 1129-1131.
30. Engel M, Essop M F, Close P, et al. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. J Clin Pathol 2000; 53:182-186.
31. Armstrong AA, Alexander FE, Paes RP, et al. Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. Am J Pathol 1993; 142:1683-1688.
32. Hemsrichart V, Pintong J. Association of the Epstein-Barr viruses with Hodgkin Lymphoma: An Analysis of Pediatric Cases in Thailand. J Med Assoc Thai 2005; 88(6):782-787.
33. Al-Salam S, John A, Daoud S, et al. Expression of Epstein–Barr virus in Hodgkin lymphoma in a population of United Arab Emirates nationals. Leuk Lymphoma2008; 49(9):1769-1777.
34. Karimi M, Yarmohammadi H, Ghavanini AA, et al. Epidemiological surveillance of pediatric Hodgkin's disease in southern Iran. Med Sci Monit .2002; 8:572-575. (Persian)

Original Article

Analysis of the presence of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in Iranian children by EBER in situ hybridization

Moravej Ali[2] Mozafari L[1], Najafipour S[2*], Meshkibaf MH[3], Moravej A

Received:10/14/2013 Revised:2/10/2014 Accepted:5/26/2014

1. Dept of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
2. Dept of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, , Iran.
3. Dept of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, , Iran.

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 12, No. 2, Summer 2014

Par J Med Sci 2014;12(2):57-63

Abstract

Introduction:
Epstein-Barr virus is a tumorigenic herpes virus which belongs to DNA viruses, infects, and persists in B-lymphocytes of most human beings. This virus is associated with some cases of Hodgkin's lymphoma. The aim of the present study was to investigate the presence of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in children.

Materials & Methods:
In this study, 16 formalin-fixed paraffin embedded blocks of Hodgkin's lymphoma tissue samples were collected from the archives of the Pathology Department of Fasa University of Medical Sciences. The presence of RNA transcripts encoded by the virus was examined with the EBERs in situ hybridization method.

Results:
The 16 formalin-fixed paraffin-embedded samples belonged to patients with Hodgkin's lymphoma with the mean age of 8 years (range: 4 to 12 years). They were investigated using the EBERs in situ hybridization method. In 12 specimens (75%), including 9 male and 3 female samples, the Epstein-Barr virus was present in different subtypes of Hodgkin's lymphoma. Eighty percent of mixed cellularity, 67% of nodular sclerosis and 100% of lymphocyte predominance subtypes proved positive. The presence of the Epstein-Barr virus in the age groups of 4-7 and 8-12 years was 71.5% and 77.8%, respectively.

Conclusion:
The results of the present study indicate a strong relationship between the Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in children. The relationship between the Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Iranian children follows a pattern similar to that of other developing countries.

Keywords: Epstein-BarrVirus, Hodgkin's lymphoma, in situ hybridization, EBER

* Corresponding author, Email: sohrabnajafipour@yahoo.com