دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مولکولار اپیدمیولوژی پاپیلوماویروس انسانی در ناخنک چشمی

میشار کلیشادی
کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
ماندانا کلیشادی
فوق تخصص چشم، بیمارستان ۵ آذر گرگان، ایران
عبدالوهاب مرادی
استاد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
مسعود بازوری
کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
علیجان تبرائی
دانشیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: علیجان تبرائی
پست الکترونیک: alijant@yahoo.com
تلفن : ۰۹۱۱۲۷۳۳۳۲۱
آدرس: مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت: ۹۳/۹/۹
ویرایش پایانی: ۹۳/۱۱/۱۰
پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: *ناخنک یک ضایعه خوش خیم چشمی با شیوع جهانی است که معمولاً روی ملتحمه ایجاد می‌شود و به تدریج به سمت قرنیه رشد می‌کند و در نهایت سبب کاهش بینایی می شود. هنوز علت مشخصی برای آن یافت نشده است. با وجود گزارش های متعدد، مبنی بر حضور ویروس پاپیلوما ویروس در بافت ناخنک، هنوز اتفاق نظری در مورد نقش این ویروس در ایجاد ناخنک وجود ندارد، مطالعه حاضر به منظور بررسی حضور پاپیلوما ویروس در بافت ناخنک چشمی انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه مورد-شاهدی روی ۵۰ نمونه بافتی بیمارانی که تحت عمل جراحی ناخنک چشمی قرار گرفته بودند و ۱۰ نمونه بافت ملتحمه چشم طبیعی بیمارانی که تحت عمل جراحی چشمی غیر از ناخنک قرار گرفته بودند، انجام شد. وجود ویروس پاپیلوما با استفاده از روش PCR بررسی شد .*

یافته ها: *در هیچ یک از نمونه ها و گروه کنترل موارد آلودگی به پاپیلوماویروس یافت نشد. هر دو گروه از نظر ژن بتا گلوبولین که برای بررسی کیفیت استخراج DNA استفاده شده بود، مثبت بودند.*

نتیجه گیری: *در مطالعه حاضر، با توجه به عدم حضور پاپیلوما ویروس ها در بافت پتریژیوم به نظر می رسد که عوامل دیگری در ایجاد این بیماری نقش داشته باشند.*

واژه های کلیدی: *ناخنک چشمی ، پاپیلوما ویروس ، PCR*

آدرس مقاله
کلیشادی م ، کلیشادی م، مرادی ع، بازوری م، تبرائی ع" مولکولار اپیدمیولوژی پاپیلوماویروس انسانی در ناخنک چشمی" مجله علوم آزمایشگاهی، مرداد و شهریور۹۴، دوره نهم (شماره ۳)،۱۵۰-۱۴۳

مقدمه

پتریژیوم (pterygium) یا ناخنک، یک ضایعه گوشتی مثلثی شکل است که از سفیدی چشم (ملتحمه) روی سیاهی چشم (قرنیه)کشیده می‌شود. این ضایعه ناشی از رشد خوش‌خیم بافت پیوندی و رگهای ملتحمه است و با تغییر شکل قرنیه، باعث ایجاد آستیگماتیسم و تار شدن دید افراد می شود (۱). ظاهر ناخوشایند ، کاهش تحمل نسبت به وجود بافت خارجی در چشم و در نهایت، کاهش دید، عواملی برای مراجعه بیماران به چشم پزشک محسوب می شوند . در حال حاضر جراحی، درمان انتخابی برای ناخنک است ولی به علت عود شایع، این بیماری همچنان به صورت یک معضل جدی در دنیای پزشکی بشمار می رود (۱). شیوع ناخنک در سراسر دنیا بین ۳۷/۴۶-۰/۳ در صد گزارش شده است(۲). مطالعات اپیدمیولوژیک بر روی جمعیت نواحی وسیع جغرافیایی، حاکی از نقش عوامل محیطی با فاکتورهای خطر اصلی و فرعی مانند اشعه ماوراءبنفش نور خورشید، شرایط آب و هوایی ، عرض جغرافیایی و همچنین سن و عوامل ارثی در پاتوژنز ناخنک می باشد(۳). طبق نظر بسیاری از محققین ، بروز ناخنک به دلیل ثاثیر توأم اشعه فرابنفش جذب شده توسط چشم و یک عامل انکوژنیک صورت می گیرد. حضور DNA ویروسی در بافت ناخنک این فرضیه را بوجود می آورد که ممکن است ویروس ها در ایجاد ناخنک نقش داشته باشند(۳). هنوز مدرک محکمی مبنی بر نقش عفونت ویروسها در ایجاد ناخنک وجودندارد. اگرچه تحقیقات اخیر حضور ویروسهای انکوژنیک مانند پاپیلوما ویروسها، هرپس ویروسها و ابشتاین بار ویروس را گزارش داده اند. در میان این ویروس ها، حضور پاپیلوما ویروس ها بیشتر از همه (۱۰۰-۰٪)گزارش شده است(۴). با توجه به میزان شیوع متفاوت حضور این ویروس در ناخنک چشمی، هدف این مطالعه بررسی حضور پاپیلوما ویروس ها را در این بافت بود.

روش بررسی

ایـن مـطالعه توصیـفی روی ۶۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان پنج آذر گرگان که تحت عمل جراحی چشمی قرار گرفته بودند، طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ انجام شد. این طرح مورد تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان قرار گرفت. از افراد شرکت کننده در مطالعه، رضایت نامه کتبی آگاهانه اخذ شد. ۵۰ نمونه بیوپسی بیمارانی که تحت عمل جراحی ناخنک قرار گرفته بودند (گروه مورد) و ۱۰ نمونه کونژنکتیوال طبیعی بیمارانی که تحت عمل جراحی چشمی غیر از ناخنک مانند آب مروارید قرار گرفته بودند(گروه کنترل)، برای حضور پاپیلوما ویروس ها با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ژنومی از بافت ناخنک طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت QIAamp DNA Mini kit (ساخت شرکت Qiagen آلمان) استخراج شد. جهت انجام PCR، ابتدا توالی های اختصاصی مربوط به ویروس HPV از بانک اطلاعاتی Gene bank جمع آوری و سپس با بهره گیری از نرم افزار Gene runner آغازگرهای عمومی برای یک توالی کوتاه بسیار حفاظت شده از ناحیه L1 ژنوم ویروس پاپیلوما انتخاب گردید که قطعه ای به طول ۱۵۰ جفت باز پس از مرحله PCR تولید نمود(۵) (جدول ۱).

جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر از دستگاه Peq lab, (Erlangen Germany) استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ng از DNA الگو، ۵ میکرولیتراز 10x PCR Buffer (Genet Bio (A type), Korea) ، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی وعقبی (10mM) ، ۳ میکرولیتراز Mgcl2(Genet Bio (A type), Korea)(25mM)، ۱ میکرولیتر از dNTP (Genet Bio (A type), Korea)(10mM) ، ۰/۵میکرولیتراز (5 u/µl) Taq DNA polymerase (Genet Bio (A type), Korea صورت گرفت. پروتکل دمایی مورد استفاده عبارت بود از یک سیکل ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل تکراری شامل ۹۴ درجه به مدت۱/۵ دقیقه،۴۰ درجه به مدت۲ دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. برای مشاهده محصولPCR، ۱۰ میکرولیتراز محصول PCR با ۲ میکرولیترازبافر نمونه گذاری (loading buffer 6x) مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید منتقل گردید. پس از آن ژل در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید. در تحقیق حاضر سلول های Hela به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مقدارDNA با دستگاه بیوفتومتر اندازه گیری شد

و سپس برای سنجش قابلیت DNA برای انجام PCR، از پرایمر ژن بتا گلوبین:

داده ها با استفاده از نرم افزار (SPSS(ver.16 و آزمون کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند وسطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

به مرکز آموزشی درمانی پنج آذر گرگان که تحت عمل میانگین سنی افراد ۱۶/۹± ۶۱/۱ سال و دامنه سنی ۲۲ تا ۸۵ سال بود. با توجه به اینکه در هیچ یک از نمونه ها موارد آلودگی به پاپیلوماویروس یافت نشد، آلودگی به عفونت پاپیلوما ویروس با هیچکدام از پارامترها ارتباط نخواهد داشت. با این حال اطلاعات مهم در این مطالعه به این صورت بود: ۲۰ نفر(۴۰٪) از بیماران، مرد و ۳۰ نفر(۶۰٪) آنها، زن بودند. ۱۳ نفر(۲۶٪) آنها *ناخنک یک‌طرفه* داشتند. در ۴۲ چشم(۸۴٪)، ناخنک از نوع اولیه و در بقیه از نوع عود مجدد بودند. اکثر بیماران سابقه کونژکتیویت داشتند. ۲ مورد (۴٪) سابقه خانوادگی ابتلاء به ناخنک را داشتند. فقط ۵ مورد (۱۰٪)دارای شغل هایی بودند که مستلزم تماس طولانی با نور آفتاب بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای درونی و بیرونی برای تشخیص پاپیلوما ویروس و کنترل مثبت

نام پرایمر	GenBank	قطبیت	آغازگر
$GP5^{+}$	KC894676.1	Forward	5'- TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
$GP6^{+}$	KC894676.1	Reverse	5′- GAAAAATAAACTGTAATCATATTC-3′
PCO3	EU760958.1	Forward	5'-ACACAACTGTGTTCACTA GC-3'
PCO4	EU760958.1	Reverse	5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'

جدول ۲- فراوانی عفونت پاپیلوما ویروس در بافت ناخنک در کشورهای مختلف (٤, ۹, ۱۰)

کشور/ سال	تعدادنمونه	نوع نمونه	حضورژنوم ویروس (٪)	تیپهای پاپیلوما ویروس	روش تشخیص
آمریکا /۱۹۸۹	٦	بیوپسی	۰	----------	PCR
آمریکا/۱۹۹۹	۱۳	بیوپسی	۰	----------	PCR
تایوان /۲۰۰۳	٦٥	بیوپسی	۰	----------	PCR
ایتالیا/۲۰۰۳	۱۷	بیوپسی	٪۱۰۰	٥۲, ٥٤, candHPV۹۰	PCR
اکوادور/۲۰۰۳	۲٤	بیوپسی	٪۲۱	٥۲, ٥٤, candHPV۹۰	PCR
برزیل/۲۰۰٦	۳٦	بیوپسی	۰	----------	PCR
دانمارک/۲۰۰۷	۹۰	بیوپسی	٪٤/٤	----------	PCR/ISH
ژاپن/۲۰۰۸	٤۲	بیوپسی	٪٤/۸	----------	Hybrid capture II (HC-II) / PCR
ترکیه/۲۰۰۸	٤۰	بیوپسی	٪۲۲/٥	----------	PCR
تایوان /۲۰۰۹	۱۲۹	بیوپسی	٪۲٤	۱٦, ۱۸	Nested- PCR
هلند/۲۰۰۹	٥۸	بیوپسی	٪۲۷/٦	٦, ۱٦, ۱۸	PCR
تایوان/۲۰۱۰	٦۲	بیوپسی	٪۳/۲	۱۸	PCR
استرالیا/۲۰۱۳	۱٦۰	بافت پارافینه شده	۰	--------	Nested- PCR
مالزی/۲۰۱٤	٤٥	بیوپسی	٪٦٤/٤	۱٦, ۱۸, ٥۸, ٥۹	Nested- PCR

بحث

تاکنون تئوری های بسیاری برای توضیح علل بروز بیماری ناخنک مطرح شده است، ولی هنوز مکانیسم های بیولوژیک و پاتوژنتیک ایجاد کننده این بیماری به طور کامل شناخته نشده اند. تکثیر تدریجی و نامحدود سلولهای لیمبوس به طرف قرنیه، عود مجدد ناخنک پس از عمل جراحی (۴۶٪)، بیان غیر طبیعی پروتئین های سرکوبگر تومور مانند p53 و در بعضی موارد، حضور بعضی ویروس های انکوژنیک مانند پاپیلوما ویروس های انسانی(HPV)، ابشتاین بار ویروس (EBV)، ماهیت نئوپلاستیک بودن این لژیون را تائید می کند(۳, ۶). نتایج بعضی مطالعات این تصور را ایجادکرده است که شاید نقش این ویروس ها در ایجاد ناخنک به دلیل تغییر در بیان پروتئین P53 که یک تنظیم کننده کلیدی رشد سلول و *پروتئین* سرکوبگر تومور است، باشد (۷). بیان غیر طبیعی پروتئین p53، پایداری آن و جلوگیری از آپوپتوز بیشترین وقایعی است که در سلولهای بافت ناخنک گزارش شده است(۷). این بر خلاف جریانات طبیعی در سلول های سالم می باشد. با توجه به اینکه در سلول های طبیعی، پروتئین p53 مدت زمان کمی پس از تولید، تجزیه میشود، میزان آن در این سلول ها بسیار کم است. هنگامی که در چرخه سلولی به ملکول DNAصدمه غیر قابل ترمیم وارد شود، سیگنال های صادره باعث فسفریلاسیون پروتئین p53 میشود که به موجب آن، بـاعث پایداری ایـن پـروتـئین شده و میزان آن در سلول افزایش می یابد . افزایش میزان این پروتئین باعث تاثیر بروی چندین ژن و افزایش محصولات آنها می شود. از جمله این ژنها میتوان به ژ نهای PUMA و PIG3 اشاره نمود که باعث القاء مرگ سلولی یا همان آپوپتوزیس می شوند(۴، ۸). در مطالعه ما، هیچ یک از نمونه های بافت بیماران از نظر عفونت به پاپیلوما ویروس مثبت نبودند که با نتایج بعضی محققین دیگر در سایر مناطق مطابقت دارد. اگر چه اکثر مقالات ارتباط بین این ویروس و پتریژیوم را گزارش داده اند (جدول ۲).

نتیجه گیری

با توجه به میزان شیوع متفاوت حضور این ویروس در ناخنک چشمی، به نظر می رسد پاپیلوماویروس ها همانند سایر فاکتورها ممکن است فقط نقش کمکی در ایجاد ناخنک داشته باشند و عوامل دیگری مهمتر از پاپیلوماویروس ها در ایجاد این بیماری دخالت داشته باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۲۱۱۲۰۱۹۴)مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی بود و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان به انجام رسید. بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارکنان بخش های چشم و اتاق عمل مرکز آموزشی درمانی پنجم آذر گرگان تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Zhong H, Cha X, Wei T, Lin X, Li X, Li J, et al. *Prevalence of and risk factors for pterygium in rural adult chinese populations of the Bai nationality in Dali: the Yunnan Minority Eye Study.* Investigative ophthalmology & visual science. 2012; 53(10): 6617-21.

2. Tano T, Ono K, Hiratsuka Y, Otani K, Sekiguchi M, Konno S, et al. *Prevalence of pterygium in a population in Northern Japan: the Locomotive Syndrome and Health Outcome in Aizu Cohort Study.* Acta ophthalmologica. 2013;91(3):e232-e6.

3. Detorakis E, Drakonaki E, Spandidos D. *Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium.* International journal of molecular medicine. 2000;6(1):35-76.

4. Di Girolamo N. *Association of human papilloma virus with pterygia and ocular-surface squamous neoplasia.* Eye. 2011; 26(2): 202-11.

5. Moradi A, Nosrat SB, Besharat S. *Molecular Epidemiology of High-Risk Types of Human Papillomaviruses (16, 18) in Pap-Smear, the North East of Iran.* Iranian Journal of Cancer Prevention. 2011; 4(3): 135-40.

6. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. *Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium.* Cornea. 2001; 20(2): 164-7.

7. Rodrigues F, Arruda J, Silva R, Moura K. *TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium.* Genet Mol Res. 2008; 7(4): 1251-8.

8. Tsai Y-Y, Chang C-C, Chiang C-C, Yeh K-T, Chen P-L, Chang C-H, et al. *HPV infection and p53 inactivation in pterygium.* Molecular vision. 2009; 15: 1092-7.

9. Woods M, Chow S, Heng B, Glenn W, Whitaker N, Waring D, et al. *Detecting Human Papillomavirus in Ocular Surface Diseases.* Investigative ophthalmology & visual science. 2013; 54(13): 8069-78.

10. Chong PP, Tung CH, Yajima M, Chin FW, Yeng CLS, Go ES, et al. *Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus (HPV) in pterygia in multi-ethnic patients in the Malay Peninsula*. Acta ophthalmologica. 2014; 92(7): e569-e79.

Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus in Pterygium

Kelishadi, M. (MSc)
MSc of Virology, School of Medicine, Research Center of Medical Laboratory, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Kelishadi, M. (MD)
Ophthalmology Fellowship, Department of Eye, Panje Azar Hospital, Gorgan, Iran

Moradi, A. (PhD)
Professor of Virology, Laboratory Science Research Center, School of Nedicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Bazouri, M. (BSc)
BSc of Microbiology, Laboratory Science Research Center, School of Nedicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Tabaraei, A. (PhD)
Associate Professor of Virology, Infectious Diseases Research Center, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Corresponding Author: Tabaraei, A.

Email: alijant@yahoo.com

Received: 30 Nov 2014
Revised: 30 Jan 2015
Accepted: 2 Feb 2015

Abstract

Background and Objective: Ophthalmic pterygium is a potentially vision-threatening lesion of unknown etiology that often extends on the corneal surface and has a worldwide distribution. Despite various studies, the pathogenesis of pterygium remains unclear and the involvement of human papillomavirus is controversial. We aimed to investigate the involvement of papillomavirus in pterygium formation.

Material and Methods: This case-control study was conducted on 50 tissue specimens of pterygium from the patients who had pterygium surgery as the case group and 10 conjunctival biopsy specimens of individuals without pterygium including the patients with cataract surgery, as controls. The evidence of papillomavirus infection was tested by polymerase chain reaction (PCR).

Results: All samples, case and control, were not positive for papillomavirus. Both groups were positive for beta-globulin gene used to check the quality of extracted DNA.

Conclusion: In this study, due to the absence of papillomavirus in the context of Pterygium it seems that other factors are involved in causing the disease.

Keywords: Pterygium; Human Papilloma Virus; PCR.

This paper should be cited as: Kelishadi M, Kelishadi M, Moradi A, Bazouri M, Tabaraei A. [Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus in Pterygium]mljgoums. 2015; 9(3): 135-140[Article in Persian]