

ایجاد رده سلولی لنفوسیت T آلوده به ویروس HTLV-I در استان خراسان

جلیل توکل افشاری* Ph.D.، عباس شیردل** M.D.، امیررضا برومند* M.D.،
محمد رضا عباس زادگان*** Ph.D.

* آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی مشهد - پژوهشکده بوعلی - بخش ایمنولوژی و کشت سلولی - مشهد - ایران
** دانشگاه علوم پزشکی مشهد - بیمارستان قائم «عج» - گروه داخلی - بخش خون
*** دانشگاه علوم پزشکی مشهد - پژوهشکده بوعلی - بخش ژنتیک مولکولی

خلاصه

ویروس HTLV-I یک ویروس متعلق به خانواده رتروویروسهاست که دارای مناطق آندمیک محدود در جهان است. یکی از این مناطق آندمیک در جهان در کشور ایران و در استان خراسان واقع شده است که میزان شیوع این ویروس در این منطقه آندمیک ۲/۳٪ گزارش شده است. ثابت شده است که این ویروس عامل دو بیماری مهم و شناخته شده ATL یا Adult T-Cell Lymphoma and Lukemia و بیماری HAM/TSP یا HTLV-I Associated Myelopathy است که این دو بیماری در مناطق آندمیک برای این ویروس از شیوع بالایی برخوردار است. برای مطالعه ابعاد مختلف این ویروس و بیماریهای مرتبط با آن، ما نیاز به دسترسی دائمی به این ویروس از طریق فراهم کردن یک رده سلولی Cell Line اختصاصی برای آن داریم. در این مطالعه، برای اولین بار ما موفق به ایجاد یک رده سلولی لنفوسیت T عفونی شده با ویروس HTLV-I از بیماران مبتلا به ATL با روش تحریک غیراختصاصی لنفوسیتها بصورت غیر وابسته با آنتی ژن از منطقه آندمیک خراسان شدیم. آلودگی این رده سلولی بوسیله دو روش IFA و PCR به اثبات رسید. شبیه چنین رده‌های سلولی قبلاً برای سایر مناطق آندمیک این ویروس نظیر ژاپن و آمریکای شمالی نیز ساخته شده است.

واژه‌های کلیدی: HTLV-I، خراسان، رده سلولی، کشت سلولی، لوسمی سلول T

مقدمه

اطلاعات ژنتیکی شان بجای DNA با RNA کدبندی می‌شوند. رتروویروسها دارای یک DNA پلی‌مراز وابسته به RNA هستند و نام رتروویروس نیز به این نکته اشاره دارد که اطلاعات بفرم RNA در سلول میزبان، بفرم DNA

یکی از مشکلات کنونی استان خراسان، شیوع نوعی ویروس از خانواده رتروویروسها بنام HTLV-I است [۱]. رتروویروسها دارای چرخه ژنتیکی منحصر بفردی هستند که بواسطه آن

هدف از این تحقیق ایجاد رده سلولی T آلوده به ویروس HTLV-I است تا زمینه‌ای مساعد برای مطالعات آینده در منطقه آندمیک خراسان فراهم کنیم.

مواد و روشها

الف: انتخاب بیماران. از آنجائیکه بهترین انتخاب برای تهیه رده سلولی آلوده به ویروس HTLV-I بیماران مبتلا به ATL هستند، لذا از میان بیماران بستری شده در بخش خون بیمارستان قائم، بیماران مبتلا به ATL انتخاب و نمونه‌گیری از ایشان انجام شد [۱۸،۱۴]. معیارهای تشخیصی برای ATL در این بیماران عبارت بودند از: الف) معیارهای بالینی. شامل شروع بیماری در سنین بعد از بلوغ، سیر معمولاً حاد بیماری، لنفادنوپاتی و هپاتواسپلنومگالی و راشهای جلدی مقاوم به درمان در بیماران خراسانی، ب) معیارهای پاراکلینیکی. شامل هیپرلکوسیتوز همراه با لنفوسیتوز قابل توجه، مشاهده لنفوسیت‌های آتیپیک در اسمیر خون محیطی، وجود انفیلتراسیون لنفوسیت‌های با هسته‌های درشت و پراکنده در دم و اپیدرم، افزایش آنزیمی ALP و LDH-H، اثبات هپاتواسپلنومگالی در سونوگرافی و در نهایت مثبت بودن آزمون ELISA و وسترن‌بلات برای HTLV-I [۱۹]. پس از تشخیص قطعی ATL و قبل از شروع شیمی درمانی، اقدام به گرفتن نمونه خون محیطی می‌کردیم. بر همین اساس بیمار ذیل با تشخیص ATL انتخاب شد: خانم ۳۷ ساله متأهل که از بخش درماتولوژی با تشخیص لنفوم پوستی به سرویس هماتولوژی ارجاع شده بود. بیمار از ۳ ماه قبل از بستری، دچار راشهای جلدی بدون خارش شده بود که این راشها بتدریج گسترش یافته در سراسر بدن بودند. ابتدا بیمار تحت درمان درماتیت قرار گرفته بود ولی بدلیل مقاومت به درمان و وجود علائم فیزیکی چون اتساع شکم (Distension)، حساسیت شکمی (Tenderness)، ادم گوده‌گذار (Pitting Edema) روی اندامها و ایکتیوز جلدی منتشر با شک به لنفوم پوستی تحت بیوپسی جلدی قرار گرفته بود. در بیوپسی پوست از این بیمار انفیلتراسیون منتشر سلولهای منونوکلئار با هسته‌های درشت نامنظم در اطراف عروق نواحی دم و اپیدرم که

نسخه‌برداری می‌شوند [۳-۱]. ویروس HTLV-I عامل دو بیماری مهم Adult T-Cell Leukemia (ATL) و همچنین بیماری HTLV-I Associated Myelopathy (HAM/TSP) است [۵،۴]. همچنین برخی بیماریهای خودایمنی نظیر Uveitis و Polymyositis در ارتباط با این ویروس شناخته شده‌اند. مناطق آندمیک آلوده به این ویروس شامل جنوب غربی ژاپن، جزائر کارائیب و برخی نواحی آمریکا بوده و نقاط دیگر دنیا با شیوع کمتر ویروس مانند تایوان، برخی نواحی آفریقا و اسرائیل می‌باشد [۸،۷،۶،۳،۲]. منطقه جدیدی که در سال ۱۳۷۱ بعنوان یک منطقه آندمیک آلوده به این ویروس در جهان گزارش شده است شمال شرق ایران می‌باشد.

در برخی گزارشات شیوع آلودگی در استان خراسان و در جمعیت عمومی تا ۲/۳٪ بوده است [۱]. انتقال عفونت نیز از طریق خون و فرآورده‌های خونی و تماس جنسی و احتمالاً از طریق شیر مادر است و از زمان آلودگی به این ویروس تا بروز علائم بیماری، دوره کمون طولانی مدتی طی می‌شود که در طی این مدت فرد آلوده می‌تواند بعنوان یک عامل انتقال ویروس (Healthy Carrier) عمل نماید [۹،۵،۴]. مشکلی که در مسیر تحقیقاتی در ارتباط با این ویروس وجود دارد، فقدان مدل حیوانی برای بررسی سیر بیماریزایی و تکثیر ویروس می‌باشد و این موضوع باعث محدود شدن محققین به بررسی افرادی می‌شود که ویروس در ایشان منجر به عارضه شده است. وجود چندین رده سلولی T آلوده به این ویروس که بوسیله محققین مختلف در مناطق آندمیک جهان تهیه شده است امروزه در بسیاری از تحقیقات در مورد این ویروس بکار می‌رود [۱۴-۱۰].

با توجه به آندمیک بودن این ویروس در استان خراسان، تهیه رده سلولی T آلوده به این ویروس محیطی برای تکثیر این ویروس در خارج از بدن انسان فراهم می‌کند تا بتوان برای تحقیقات آینده نظیر کارایی روشهای مختلف جلوگیری از تکثیر ویروس، مطالعه بر روی فعالیتهای داخل سلولی ویروس از قبیل نسخه‌برداری DNA، سنتز پروتئین و متابولیسم انرژی و مطالعات کلینیکی و پاراکلینیکی در مورد بیماریهای مرتبط با ویروس از این رده سلولی استفاده کرد [۱۸-۱۵].

طی ۱۷ مرتبه پاساژ سلولی در نهایت رده سلولی T آلوده به HTLV-I ایجاد شد. برای اثبات آلودگی این رده سلولی بدست آمده نخست با کمک تکنیک IFA (Indirect Immunofluorescence Assay) و بسا استفاده از کونژوگه FITC (Fluorescein Isothiocyanate) این آلودگی تأیید و در انتها برای اثبات قطعی آلودگی روش PCR (Polymerase Chain Reaction) انجام شد.

ج: روش IFA. در روش IFA ابتدا لئوسیت‌های T بدست آمده از رده سلولی که آنتی‌ژن‌های اختصاصی HTLV-I را در سطح خود عرضه می‌کنند را در سطح لام مخصوص با استفاده از استون (Aceton) فیکس کردیم، سپس از سرم خون بیماران HAM/TSP که حاوی آنتی‌بادی اختصاصی ضد HTLV-I است بر روی لام اضافه نمودیم تا یک کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در سطح سلول‌های آلوده ایجاد شد. پس از شستشوی لام، آنتی‌بادی ثانویه که بوسیله ماده فلورسنت FITC-Conjugated Goat Anti-Human IgG یا (FITC) نشان‌دار شده است، به کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی که می‌بایست در سطح سلول‌ها تشکیل شده باشد افزودیم تا به این وسیله کمپلکس مزبور فلورسنت شود. با مشاهده این سلول‌های آلوده در زیر میکروسکوپ فلورسانت عفونت سلول‌های آلوده تأیید شد [۲۱،۱۴].

د: روش PCR. در تکنیک PCR در مرحله اول DNA رده سلولی لئوسیت‌های T بدست آمده به روش آنزیمی استخراج شد. در این تکنیک برای استخراج DNA، تعداد $1/5 \times 10^6$ سلول بوسیله آنزیم پروتیناز K (شرکت سیناژن - تهران) تحت پروسه استخراج DNA قرار گرفت [۱۶]. بوسیله آنزیم پروتیناز K در دمای حدود ۵۰ درجه سانتیگراد تمام غشاء‌های سلولی لیز شده، سپس DNA آزاد شده که بوسیله یک رزین در محیط حفظ می‌شود در مراحل بعدی با چندین مرتبه شستشو از رزین جدا می‌شود. DNA بدست آمده تحت پروسه PCR قرار داده شد.

عناصر تشکیل‌دهنده در Master Mix برای انجام PCR عبارت بودند از:

10x buffer 2.1

MgCl₂ 0.75 μl

مطرح‌کننده لئوم پوستی است، گزارش شده است. بر این اساس بیمار از سرویس درماتولوژی به سرویس هماتولوژی ارجاع شد و در بررسی‌های انجام شده در این سرویس علائم دال بر ATL بشرح ذیل آمده است: هپاتواسپلنومگالی در سونوگرافی، افزایش آنزیم‌های LDH-H; 1174 Units (Normal Level: <220 Units) و ALP; 225 Units Level: 125 Units (Normal Level: <125 Units) ۴۶۰۰۰ هپرلکوسیتوز با ۴۳٪ لئف و در نهایت ELISA مثبت برای HTLV-I که در اسمیر خون محیطی بیمار هم Flower-Cells مشهود بوده‌اند.

ب: تهیه رده سلولی. نمونه خون محیطی به میزان ۲۰^{cc} از بیمار در شرایط کاملاً استریل و همراه با ماده ضد انعقاد EDTA (EDTA/10^{cc} Whole Blood/0.5^{cc})، تهیه شد. لئوسیت‌های خون محیطی بوسیله محلول فایکول جداسازی گردید، سپس سلول‌ها ۲ بار بوسیله محلول HANKS شستشو داده شده‌اند. سلول‌های لئوسیتی بدست آمده تحت پروسه Bioavailability Test از نظر تعداد سلول‌های زنده با استفاده از محلول تریپان بلو ۲۰w/v قرار گرفت [۲۰،۱۳]. سپس سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640، به همراه ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ IU/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین و در شرایط مرطوب ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ در فلاسک‌های کشت ۶ خانه رشد داده شدند. جهت پرولیفراسیون سلولی با استفاده از مدت تحریک غیر اختصاصی لئوسیت‌ها بصورت غیر وابسته به آنتی‌ژن یا Antigen-Nonspecific Stimulation از محرک رشد PHA-M (فیتوماگلو تینین M) استفاده می‌شد که در این روش PHA را با غلظت ۵ μg/ml در دوره‌های ۷-۴ روزه بکار بردیم [۱۵،۱۳].

پس از هر بار تحریک لئوسیت‌ها بوسیله PHA روزانه، سلول‌ها از نظر تغییرات جمعیت سلولی، تغییرات رنگ محیط کشت و آلودگی یا عدم آلودگی به قارچ یا باکتری کنترل می‌شدند. سپس در زمان مناسب برای پاساژ سلول‌ها مقدار ۳-۲/۵ سی‌سی محیط کشت جدید به همان حفره اضافه می‌شد و سلول‌ها به آرامی در محیط کشت پخش می‌شدند تا به جمعیت سلولی نسبتاً هموزنی دست یابیم، سپس کل محیط کشت را به دو قسمت مساوی تقسیم می‌کردیم و به این ترتیب

قرار گرفت: ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه جهت Denaturation، ۳۰ سیکل متوالی شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه، ۴۰ ثانیه دمای ۵۳ و ۴۰ ثانیه دمای ۶۸ درجه که بترتیب شامل Denaturation، Annealing و Extension خواهد بود و سپس در مرحله Final Extension از دمای ۶۸ درجه بمدت ۵ دقیقه استفاده شد [۲۱]. محصول PCR حاصل در دمای ۴ درجه نگهداری شد تا به مرحله الکتروفورز برده شود. الکتروفورز به همراه نمونه استاندارد یا Ladder و همچنین رده سلولی دیگر بنام (MT2) که بعنوان کنترل مثبت تلقی می شود، انجام شد و مقایسه صورت گرفت.

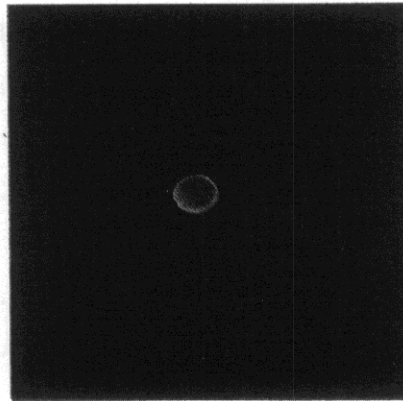
dNTP 0.5μl
Primer(Reverse) 0.5μl
ddH₂O 19.1μl
Primer(Forward) 0.5μl
Taq.pol 0.125μl
DNA 1 μg

توالی پرایمرهای (شرکت طوبی نگین - تهران) مورد استفاده نیز به شرح ذیل است:

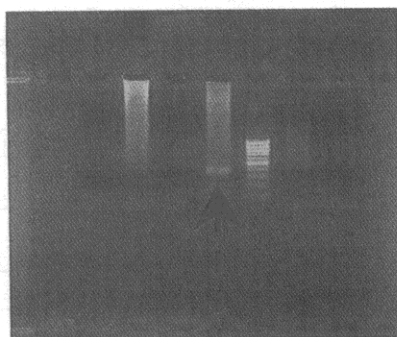
TAX Forward: 5' - GGA TAC CCA GTC TAC GTG TTT G-3'

TAX Reverse : 5' - CGA AAC ATT GGTGAG GAA GGC-3'

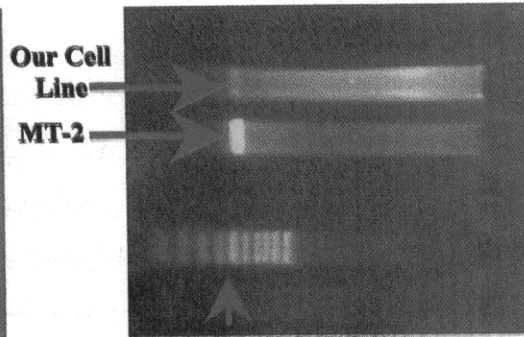
حجم کلی محلول که ۲۵μl بود و طبق پروتکل زیر تحت PCR



شکل ۱. تکنیک IFA جهت نشان دادن آلودگی رده سلولی تولید شده به ویروس HTLV-I



522 bp



522 bp

شکل ۲. تکنیک PCR برای اثبات آلودگی رده سلولی ایجاد شده و مقایسه آن با رده سلولی MT-2 (بعنوان استاندارد)

بحث

مختلف از جمله ATL و HAM/TSP و همچنین شواهدی برای اثبات کارسینوماتو و التهابی این ویروس بدست آید [۱۶-۱۸، ۲۳]. با تهیه این رده سلولی T آلوده به ویروس HTLV-I از منطقه آندمیک خراسان، امکان مطالعه بر روی جنبه‌های مختلف بیماری‌های مرتبط با این ویروس با توجه به شرایط اقلیمی فراهم می‌شود. امکان بکارگیری این رده سلولی برای تهیه واکسن جهت پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با این ویروس و همچنین فراهم شدن امکان بررسی اثرات داروهای مناسب برای مهار این ویروس از جمله کاربردهای ایجاد این رده سلولی می‌باشد. مراحل تعیین خصوصیات فنوتیپیک و سکانس DNA برای این رده سلولی و مقایسه آن با دو رده سلولی ایجاد شده MT2 و HUT 102 در دست اجرا می‌باشد.

منابع

۱. فریدحسینی رضا، صفائی بیژن (۱۳۷۱). بررسی ویروس‌شناسی سرواییدمیولوژی HTLV-I در استان خراسان، مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۳۹، صفحات ۸۹-۸۶.
2. Fauci AS, and Longo D (1998). The human retroviruses. In: Principles of internal medicine, edited by AF Harrison. New York, McGraw-Hill companies, pp.1108-110.
3. Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, and Yodoi J (1997). Adult T-cell Leukemia in Japan. In: Seno S, Takaku F, Irino S, eds. Topics in hematology. Amesterdam; Exceta Medica, pp.73-78.
4. Osame M, Usuku J, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, and Igata A (1986). HTLV-I associated myelopathy: a new clinical entity. Lancet; 1:1031-32.
5. Kuefler PR, and Bunn PA (1986). Adult T-cell leukaemia/lymphoma. Clin Haematol; 15: 695-726.
6. Levine PH, Jafee ES, Manns A, Murphy EL, Clark J, and Blattner, WA (1988). Human T-cell lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia/lymphoma outside of Japan and the Caribbean Basin. Yale J Biol Med; 61: 215-22.
7. Blattner WA, Kalyanaraman VS, Rober-Guroff M, and Sliki A (1982). The human type-C retrovirus, HTLV-I, in blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. Int J Cancers; 30: 257-64.
8. Blattner WA, Blayney DW, Robert-Guroff M, and Nakao Y (1983). Epidemiology of human T-cell leukemia/lymphoma virus. J Infe Dis; 147: 406-16.
9. Shirakawa F, Tanaka Y, oda S, tajima K, and Hayami M (1986). Immunosuppressive factors from adult T-cell leukemia cells. Cancer Res; 46: 4458-62.
10. Gotoh Y, Sugamura K, and Hinuma Y (1982). Healthy carriers of a human retrovirus, adult T-cell leukemia virus (ATLV): demonstration by clonal culture of ATLV-carrying T cells from peripheral blood. Proc Natl Acad Sci USA; 79: 4780-82.

رده سلولی T آلوده به HTLV-I، با استفاده از لئوسیت‌های خون محیطی بیمار مبتلا به ATL که با فایکول جدا شده بودند، پس از ۱۷ مرتبه پاساژ سلولی و روش تحریک پلی‌کلونال و بکارگیری PHA-M ایجاد شد. نتایج حاصله جهت اثبات آلودگی رده سلولی T با روش PCR نشانگر یک باند اختصاصی با ۵۲۲ bp می‌باشد. باند اختصاصی ایجاد شده مشابه باند کنترل که از رده سلولی MT-2 بدست آمده، می‌باشد (شکل ۱). در تست ایمونوفلورسانت غیرمستقیم (IFA)، لئوسیت‌های T رده سلولی آلوده به HTLV-I، بیش از ۶۰٪ آلودگی را نشان می‌دهند (شکل ۲). بنابراین در مجموع با استفاده از تست‌های PCR و IFA ایجاد رده سلولی T آلوده به HTLV-I به اثبات می‌رسد.

ویروس HTLV-I در مناطق آندمیک عامل دو بیماری ATL و HAM/TSP می‌باشد [۸-۱۹، ۳]. با توجه به اینکه گزارشات شیوع آلودگی به این رتروویروس را در استان خراسان و در جمعیت عمومی تا ۲/۳٪ گزارش کرده‌اند، لذا هدف از این کار تحقیقاتی ایجاد رده سلولی T آلوده به HTLV-I بود [۱]. ایجاد رده‌های سلولی آلوده به ویروس HTLV-I در مناطق آندمیک امکان مطالعه و تحقیق بر روی این ویروس را فراهم می‌نماید [۱۸، ۲۲]. محققین آمریکایی و ژاپنی توانستند با ایجاد چنین رده سلولی که هر یک خاص منطقه آندمیک خودشان است، زمینه برای مطالعات فراوانی را بر روی این ویروس فراهم کنند [۷، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۲۲].

Poiesz و همکارانش (۱۹۸۰) توانستند رده سلولی MT2 را با جداسازی لئوسیت‌های خون محیطی یک بیمار مبتلا به ATL و با مجاورسازی این سلولها با لئوسیت‌های بند ناف جنین ایجاد کنند. همچنین محققین آمریکایی نیز رده سلولی T را با نام Hut 102 که آلوده به ویروس HTLV-I است را فراهم کرده‌اند [۱۵].

مطالعات بسیاری بر روی رده‌های سلولی ایجاد شده انجام پذیرفته که در نتیجه ارتباط این ویروس با بیماری‌های

11. Himuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakaim M, Matsumoto T, Kinoshita K, Shirakawa S, and Miyoshi I (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78: 6479-80.
12. Zack JA, Cann AO, Lugo JP, and Chen ISY (1988). HIV-I production from infected peripheral blood T-cells after HTLV-I induced mitogenic stimulation. *Science*; 240: 1026-29.
13. Nutman TB (1991). Establishment of T-cell line. In: current protocol in Immunology, edited by L Mayer, New York, Academic press, pp.7.19.2-7.21.4.
14. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, and Hinuma Y (1980). Type C virus particles in a cord T cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocyte and human leukemic T-cells. *Nature*; 294: 770-71.
15. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, and Gallo RC (1980). Detection and Isolation of type C retrovirus particles from fresh and culture lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Sci USA* 1980; 77: 7415-19.
16. Asou N, Kumagai T, Uekihara S, Ishii M, Sato M, Sakai K, Nishimura H, Yamaguchi K, and Takatsuki K. (1986). HTLV-I Seroprevalence in patients with malignancy. *Cancer*; 58: 903-7.
17. Miyazaki K, Yamaguchi K, Tohya T, Ohba T, Takatsuki K, and Okamura H (1991). Human T-cell leukemia virus type I infection as an oncogenic and prognostic risk factor in cervical and vaginal carcinoma. *Obstetrics and Gynecology*; 77(1): ??
18. Yoshida M, Miyoshi I, and Hinuma Y (1982). Isolation and Characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 2031-35.
19. Kawano F, Tamaguchi K, Nishimura H, Tsuda H, and Takatsuki K (1985). Variation in the clinical course of adult T-cell leukemia. *Cancer*; 55: 851-56.
20. Macdonal C (1994). Primary culture and the establishment of cell lines. In: Basic cell culture: A practical approach, edited by M Davis, Oxford University press, pp.149-178.
21. Erlich GL, Greenberg S, and Abbott AM (1990). Detection of human T-cell lymphoma/leukemia viruses. In: PCR protocols, edited by MA Innis, New Jersey, Human press, pp.325-36.
22. Morishima Y, ohya K, Morishima T, and Fukuda T (1986). Immunological studies on adult T cell leukemia virus (ATLV) carriers. *Clinic exp Immunol*; 64: 457-64.
23. Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, and Yodoi J (1977). Adult T-cell leukemia in Japan. In: *Excepta Medica, Topics in hematology*, edited by S Seno, F Takaku, and S Irino, Amesterdam, pp.73-78.