

بررسی مولکولار هرپس سیمپلکس تیپ ۶ و ۷ انسانی در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس (MS) مراکز درمانی

امیرحسین محقق^۱ فرد^۱، سمیرا میر^۲، نورالله رامرویدی^۳، الهام دامنی^۴، ساجد آیین^۵

^۱دکترای ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۲میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۳متخصص مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

^۴دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران.

^۵دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران.

نام نویسنده مسئول:

سمیرا میر

چکیده

مولتیپل اسکلروزیس از بیماری‌های خود ایمنی سیستم اعصاب مرکزی است. علل ایجاد این بیماری ناشناخته است ولی عوامل محیطی از جمله عفونت‌های ویروسی در ایجاد آن نقش دارند. در این مطالعه بیماران مبتلا مولتیپل اسکلروزیس در استان مرکزی از نظر میزان آنتی بادی علیه هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ مورد بررسی قرار گرفتند. روش کار: در مطالعه مورد شاهدهی حاضر ۵۰ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که در مراحل اولیه تشخیص بودند و هیچ گونه برنامه درمانی خاصی روی آنها انجام نشده بود.

واژگان کلیدی: هرپس سیمپلکس تیپ ۶، مالتیپل اسکلروزیس، MS.

مقدمه

بسیاری از بیماری های مزمن در انسان ممکن است مکانیسم عملکردی خود را تغییر داده و با نشان دادن یک سازوکار متفاوت، سبب بروز بیماری های خود ایمن و در نهایت درگیری شدید سیستم ایمنی فرد شوند(۱). مولتیپل اسکلروزیس (M.S) شایعترین اختلال عصبی و از بیشترین میزان بروز در جوانان برخوردار است. علائم اولیه عموماً پیش از ۵۵ سالگی آغاز می شود و در سن ۲۰ تا ۴۰ سالگی به اوج خود می رسد(۲). نسبت بیماری در زنان به مردان ۲ برابر می باشد. حدود ۳۰۰ هزار نفر را در آمریکا مبتلا کرده است. علت بیماری ناشناخته است اما ظن به نوعی مکانیسم ایمنی علیه آنتی ژنهای میلینی وجود دارد(۳). این بیماری برای اولین بار در سال ۱۸۶۷ در کشور آمریکا توسط دکتر موریس و همکاران و سپس در سال ۱۸۷۳ در کشور انگلیس شناسایی و معرفی شد(۴).

MS یک دمتیله کننده التهابی است که می تواند سبب بروز اختلالات عصبی در CNS شود. این اختلالات در سنین بین ۲۰ تا ۴۰ سال بیشتر دیده می شود(۵). در این بیماری گلوبول های سفید، ترکیبات پروتئینی غلاف میلین مانند پروتئین عمومی میلین (MBP)، PLP و اولیگوپروتئین های دندروسیتی را مورد هدف قرار داده و باعث تخریب آنها می شود، که این تخریب موجب ظهور علائم بالینی در شخص بیمار می شود(۶). ارتباط قوی بین بیماری و DR2-HLA وجود دارد عفونت های ویروسی یا سایر فاکتورها ممکن است باعث فعال شدن T-cell و آنتی بادی بر علیه سیستم عصبی مرکزی شده، که باعث شکست سد مغزی - نخاعی می شود(۷-۹). علائم بالینی به صورت ضعف، بی حالی یا ناهنجاری در یک اندام، فقدان ناگهانی یا تاری دید در یک چشم (نوریت اپتیک)، دوبینی، عدم تعادل یا اختلال عملکرد مثانه می باشد(۱۰). این علائم گذرا بوده و بعد از چند روز یا هفته از بین می روند. ممکن است چند ماه تا چند سال فاصله بین حمله اولیه تا شروع علائم عصبی باشد(۱۱). عود بیماری با عفونت آغاز شده و در زنان بیشتر در طی سه ماهه بعد از زایمان اتفاق می افتد. براساس سیر بیماری به انواع عود کننده - فروکشی کننده Relapsing-remitting، پیشرونده ی ثانویه - Secondary progressive و Primary progressive تقسیم می شود(۱۲).

برخی عوامل عفونت زای باکتریایی و ویروسی ممکن است با بروز بیماری مولتیپل ایکلروزیس در ارتباط باشند بطوریکه در سال ۱۹۴۰ یک عامل عفونی نامشخص در بروز و افزایش روند این بیماری معرفی شد(۱۳). در کنار عوامل میکروبی باکتریایی، عفونتهای ویروسی یکی از عوامل تشدید کننده M.S می باشد بطوریکه گروههای متعدد ویروس به عنوان ایتولوژی یا تشدید کننده ی آن معرفی شده اند که می توان به ویروس هرپس سیمپلکس (H.S.V)، ابشتین بار ویروس (E.B.V)، واریسلا زوستر (V.Z.V)، هرپس ویروس انسانی (H.H.V)، اوربون، سرخک و علل عفونی دیگر مانند کلامیدیا و بیماری لایم نیز در مطالعات پیدا شده اند(۱۳-۱۵).

هرپس ویروسها از عوامل نسبتاً شایع عفونت در کودکان بوده و بیماریهای سیستمیک ایجاد می کنند اما گرفتاری سیستم عصبی مهمترین تظاهر آن است. در افراد مبتلا به نقص ایمنی این عفونت میتواند کشنده باشد(۱۶)(۱۷). هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ یا H.H.V-6 در حدود ۱۲ سال پیش توسط گروهی از محققین در ایالات متحده از فردی مبتلا به ایدز جدا گردید. پس از کشف هرپس ویروس انسانی تیپ ۴ (EBV) در ۱۹۶۴، HHV-6 توسط Salahuddin و همکاران در سال ۱۹۸۶ جدا گردید(۱۸). در ابتدا بعنوان یک ویروس B لنفوتروپیک معرفی گردید ولی با بررسیهای بعدی ثابت شد که این ویروس T لنفوتروپیک می باشد. با تحقیقات گسترده نقش ویروس در بیماریهای مختلف به اثبات رسید که از جمله مهمترین این بیماریها می توان به روزیولا اینفنتوم (یکی از تب های اگزانتمی دوران کودکی) اشاره نمود. با مطالعات سروایتیدمیولوژیکی انجام شده مشخص گردید که بیش از ۹۵٪ بزرگسالان دارای آنتی بادی ضد (HHV-6) می باشند که دلالت بر تماس این افراد در گذشته با این ویروس می نماید.

برخی گزارشات نشان میدهد که بین ایجاد این بیماری و هرپس ویروس انسانی تیپ ۶ ارتباط وجود دارد(۱۹)(۲۰). در مطالعه Sander vj و همکارانش در آمریکا که حضور هرپس ویروس را در نمونه های مغزی بیماران M.S با بیماران کنترل با PCR بررسی کردند، موارد VZV, HHV6, HSV در بیماران M.S در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بوده است(۲۱). در مطالعه Christensen T و همکارانش در دانمارک، VZV و HHV6 ارتباط با M.S داشته اند(۲۲). HHV-6 و EBV در هر دو گروه کنترل و مبتلا تفاوتی نداشته است ولی در مورد HSV-1 فقط در گروه مبتلا یافت شد(۲۳). در مطالعه Siddharama در هند عفونت با کلامیدیا پنومونه، EBV, HHV-6 در پیشرفت بیماری M.S نقش داشته است(۲۴). در مطالعه P.Sundstrom و همکارانش در سوئد ارتباط بین HHV-6 با M.S وجود داشت ولی ارتباطی میان HSV، VZV و سرخک با M.S یافت نشد(۲۵). در مطالعه Khaki M و همکارانش در اراک ارتباط بین M.S و سرخک و اوربون بوده است و همه بیماران از نظر آنتی بادی EBV و پارائفلوئاز منفی بوده اند(۲۶). در مطالعه Ben Fredj N و همکارانش در تونس مشخص شد HSV-1, HSV-CMV, HHV-8۲ در هر دو گروه بیماران M.S و گروه کنترل منفی بوده است(۲۷). اما EBV, HHV-7, HHV6, VZV در هر دو گروه مثبت بوده اند که میزان آنها در گروه بیماران M.S بالاتر بوده که از میان این ویروس ها EBV و HHV-7 درصد بالاتری را به خود اختصاص داده اند.

روش انجام تحقیق

جامعه مورد مطالعه شامل کل بیماران مبتلا به M.S می باشد.

معیارهای ورود بیماران: تب توام با یکی از علائم (تهوع استفراغ، سردرد، تشنج، خواب آلودگی) وجود علائم گرفتاری سیستم عصبی مرکزی در هنگام ورود شامل علائم منتهی مثبت (سفتی گردن، کرنیک و برود زنبسکی) افزایش فشار داخل جمجمه، یافته هایعصبی غیرطبیعی و.... بود.

معیارهای خروج بیماران شامل مثبت بودن کشت باکتریایی (ازخون، مایع نخاع یا سایر نواحی استریل بدن) تغییرات مایع نخاع به نفع منتهی باکتریال، وجود سایر بیماریها به جز مننگو آنسفالیت آسپتیک.

شهرستان زاهدان



شکل ۳-۱: نقشه ی جغرافیایی استان سیستان و بلوچستان

موقعیت جغرافیایی شهرستان زاهدان

زاهدان یکی از کلان شهرهای ایران و مرکز استان سیستان و بلوچستان است و در محدوده شمالی بلوچستان (سرحد) قرار دارد. زاهدان از سمت شمال به شهرستان زابل و، از سمت جنوب به شهرستان خاش، از سمت شرق به کشورهای افغانستان و پاکستان و از سمت غرب به شهرستان فهرج و کویر لوت محدود شده است. آب و هوای زاهدان در بیش تر روزهای سال گرم و معتدل است. تنها در شب های تابستان آب و هوای این شهر رو به سردی می گراید. زاهدان از لحاظ مختصات جغرافیایی در ۶۰ درجه و ۵۱ دقیقه و ۲۵ ثانیه ° طول شرقی و ۲۹ درجه و ۳۰ دقیقه و ۴۵ ثانیه ° عرض شمالی واقع شده است. اختلاف زمان زاهدان با تهران ۳۶+ دقیقه و با گرینویچ ۲۴۶+ دقیقه است. بعد از انجام کارهای معمول در امر ضد عفونی کردن، ۲ سی سی از نمونه مایع مغزی نخاعی داخل میکروتیوپهای استریل ریخته می شود و به مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی ارسال می شود. نمونه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شوند تا زمانی که تعداد نمونه ها به ۵۰ عدد برسد. سپس از حالت فریز در آورده و مهیا می شوند.

استخراج دزوکسی نوکلئیک اسید^۱:

نمونه مایع مغزی نخاعی از ۸۰- درجه سانتیگراد در آورده و برای استخراج آماده می شوند.

^۱ DNA Extraction

استخراج DNA با استفاده از کیت viral nucleic Acid purification Kit شرکت کیاژن انجام گرفت.

محتویات کیت :

محتویات کیت viral nucleic Acid شرکت کیاژن جهت استخراج DNA بدین شرح است:

ردیف	عناوین و محتویات	تعداد در هر کیت ۵۰ تایی	حجم (میلی لیتر)
۱	پروتئیناز K (۲۵ میلی گرم)	۱	۰,۲۵
۲	ستون های اتصال	۵۰	-
۳	تیوب های ۲ میلی لیتری	۱۰۰	-
۴	Carrier RNA/DNA	۱	100
۵	بافر تخریب (LB)	۱	۱۵
۶	بافر (IRB)	۱	۲۵
۷	بافر شستشو (WB)	۱	۵۰
۸	بافر شستشو (EB)	۱	۵

مواد و وسایل مورد نیاز :

- ایزوپروپانوال
- سمپلر (متغیر)
- میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری
- دستکش لاتکس
- ورتکس
- دستگاه Hotplat
- سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) دارای روتور تیوب های ۲ میلی لیتری

مراحل انجام کار جهت استخراج DNA

- ۱) در میکروتیوب مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر نمونه مایع مغزی نخاعی به همراه ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر LB و ۵ میکرو لیتر از پروتئیناز K و ۲ میکرو لیتر Carrier RNA/DNA اضافه کردیم.
- ۲) نمونه را ورتکس کرده در دمای 65°C به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کردیم.
- ۳) در این مرحله ۱۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانوال به میکروتیوب اضافه کردیم و به مدت ۲ دقیقه در rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم.
- ۴) مخلوط را به ستون منتقل کردیم و به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم.
- ۵) ۵۰۰ میکرو لیتر بافر IRB به ستون اضافه کردیم و ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و مقدار مایعی که در پایین ستون است را نادیده گرفته و بیرون می ریزیم.
- ۶) در این مرحله شستشو توسط بافر WB انجام می شود و در ابتدا ۶۰۰ میکرو لیتر اضافه کرده و ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم و مجدداً مقدار مایع پایین ستون را بیرون می ریزیم.
- ۷) مجدداً مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر بافر WB اضافه کرده و ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم. دوباره مایع زیر ستون را out می کنیم و ستون خالی را ۲ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ جهت خشک کردن سانتریفیوژ کردیم.
- ۸) در مرحله آخر ۷۰ میکرو لیتر بافر EB که از قبل به دمای محیط رسانده اضافه کرده و ۱ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ می کنیم. ستون ها را دور انداخته می شود، محلول جمع شده در میکروتیوب حاوی DNA است که در دمای 20°C نگهداری می شود.

Real Time PCR.

بعد از استخراج DNA آزمایش Real time PCR را انجام می دهیم، در این آزمایش میزان بار ویروسی به صورت کمی مشخص می شود.

آماده سازی کیت

(۱) به کیت حاوی HHV-6 Primer/probe mix ۱۶۵ میکرولیتر آب RNase/DNase Free اضافه کردیم.
(۲) در این مرحله به HHV-6 Positive ۵۰۰ میکرولیتر Template preparation buffer اضافه می کنیم که در تهیه استانداردها مورد استفاده قرار می گیرد
(۱) 100 میکرولیتر آب به ROX اضافه کردیم.
(۲) ۲۵ آب به اضافه ۲۰ میکرولیتر از ROX آماده شده را به کپسول اضافه کردیم.
آماده سازی Mix جهت انجام آزمایش:

مواد تشکیل دهنده	حجم (میکرو لیتر)
2XqPCR	۱۰
Primer/probe Mix	۱
DNA	۵
RNase/DNase Free Water	۴
حجم نهایی	۲۰

این مرحله استاندارد سازی صورت گرفت که ۶ تیوپ نامگذاری کردیم از ۱ تا ۶ مطابق جدول زیر:

Copy Number	Standard Curve
2 x 10 ⁵ per μ l	تیوپ ۱ Positive control (RED)
2 x 10 ⁴ per μ l	تیوپ ۲
2 x 10 ³ per μ l	تیوپ ۳
2 x 10 ² per μ l	تیوپ ۴
20 per μ l	تیوپ ۵
2 per μ l	تیوپ ۶

(۱) در ابتدا ۹۰ میکرولیتر از Template preparation buffer بوسیله پیپت به داخل ۵ تیوپ می ریزیم و سپس از ۲ تا ۶ شماره گذاری می کنیم.

(۲) ۱۰ میکرولیتر از Positive control به تیوپ ۲ منتقل می کنیم.

(۳) ورتکس کرده و مرحله بعدی از تیوپ ۲، ۱۰ میکرولیتر به تیوپ ۳ انتقال دادیم و این کار را تا میکروتیوپ ۶ انجام می دهیم. شرایط دمایی:

Step	Time	Temp
Enzyme activation	2 mins	95 oC
Denaturation	10 secs	95 oC
DATA COLLECTION	60 secs	60 oC

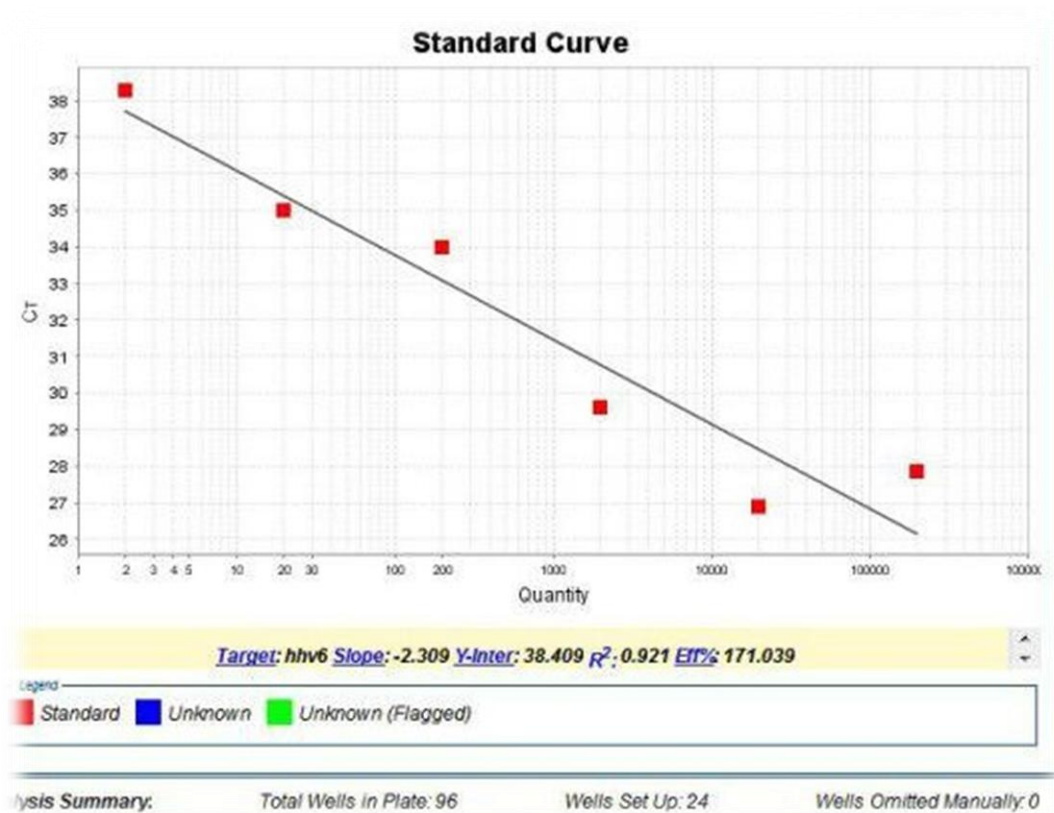
نتیجه گیری

بعد از انجام آزمایش Real Time PCR از ۵۰ نمونه همه ی آنها منفی شدند که نشان دهنده ی این است که میزان بار ویروسی در این نمونه ها صفر است.

نمایی از منحنی استاندارد:

منحنی استاندارد بر اساس CT به کمیت.

منحنی استاندارد هم در مقاله و هم در پایان نامه ذکر شود.



منابع و مراجع

- [1] Dreyfus DH. Autoimmune disease: A role for new anti-viral therapies Autoimmunity Reviews. 2011;11(2):88-97.
- [2] Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. Brain. 2006;129(3):606-16.
- [3] Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. New England Journal of Medicine. 2000;343(20):1430-8.
- [4] Grant, Alexander. Multiple Sclerosis and Related Disorders Clinical Guide to Diagnosis, Medical Management, and Rehabilitation. New York, NY: Demos Medical, 2013. Print.
- [5] Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis—[a] quiet revolution. Nat Rev Neurol. 2015;11(3):134-42.
- [6] Swanborg RH, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Infectious agents and multiple sclerosis—are Chlamydia pneumoniae and human herpes virus 6 involved? Journal of Neuroimmunology. 2003;136(1-2):1-8.
- [7] Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995;92(16):7440-4.
- [8] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol. 2015;15(9):545-58.
- [9] Thornton AM. 5.04 - Regulatory T Cells. In: McQueen CA, editor. Comprehensive Toxicology (Second Edition). Oxford: Elsevier; 2010. p. 87-107.
- [10] Knox KK, Brewer JH, Henry JM, Harrington DJ, Carrigan DR. Human Herpesvirus 6 and Multiple Sclerosis: Systemic Active Infections in Patients with Early Disease. Clinical Infectious Diseases. 2000;31(4):894-903.
- [11] Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. Nature medicine. 1997;3(12):1394-7.
- [12] Khaki M, Ghazavi A, Ghasami K, Rafei M, Payani M, Mosayebi G. Anti-human herpes virus-6 antibodies titer in patients with multiple sclerosis in Markazy Province. Arak University of Medical Sciences Journal. 2009;12(2):45-50.
- [13] Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease—Viral load, clinical manifestations and sequels. Journal of Clinical Virology. 2009;46(3):249-53.
- [14] Kocazeybek B, Karatoka B, Aslan M, Saribas S, Altintas A, Ergin S, et al. R2109 The role of Chlamydia pneumoniae and human herpes virus 6 in aetiopathogenesis of multiple sclerosis and the relation of multiple sclerosis with apolipoprotein E genotypes. International journal of antimicrobial agents. 2007;29, Supplement 2:S610.
- [15] Brudek T, Lühdorf P, Christensen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A. Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV. Journal of Neuroimmunology. 2007;187(1-2):147-55.
- [16] Shameem S, Vinod Kumar CS, Neelagund YF. Bacterial meningitis: rapid diagnosis and microbial profile: a multicentered study. J Commun Dis 2008 Jun; 40(2):111-20 .
- [17] Pohl-Koppe A, Blay M, Jager G, Weiss M.
- [18] Human herpes virus type 7 DNA in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system diseases. Eur J Pediatr 2001; 160:351-8 .
- [19] Dreyfus DH. Herpesviruses and the microbiome. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2013;132(6):1278-86.
- [20] Yao K, Honarmand S, Espinosa A, Akhyani
- [21] N, Glaser C, Jacobson S. Detection of human
- [22] herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. Annals of Neurology 2009; 65(3):257-67 .
- [23] Virtanen JO, Farkkila M, Multanen J, Uotila

- [24] L, Jaaskelainen AJ, Vaheri A, et al. Evidence for human herpesvirus 6 variant antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J of Neurovirology* 2007; 13(4):347-52 .
- [25] Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellot WW. Detection of herpes viridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neuroviral* 1996; 2(4): 249-58
- [26] Christensen T. Human herpes viruses in M.S. *Int M.S J* 2007; 14(2): 41-7.
- [27] Ferrante P, Mancuso R, Pagani E, et al. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol* 2000; 6(2):109-14 .
- [28] Siddharama P, Subramaniam S. The role of infections in the pathogenesis and course of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol* 2010; 13(2):80-86.
- [29] Sundstorm P, Juto P, Wadell G, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 2277-2282.
- [30] Bantinac T, Petranovic D, Zamolo G, et al. Lyme borreliosis and multiple sclerosis are associated with primary effusion lymphoma. *Med Hypotheses* 2007; 69(1):117-9.
- [31] Khaki M, Ghazavi A, Ghasemi K, et al. [Evaluation of viral antibodies in Iranian multiple sclerosis patients] Persian. *Department of Immunology and Microbiology* 2011; 16(3)