

مقاله تحقیقی

مطالعه ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ و سیتومگالوویروس در بیماران آلزایمری

سپیده خدامرادی*، محمد حسن شاه حسینی، طاهر محمدیان، آتوسا فردوسی

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: Sepideh.khodamoradi2020@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۶

چکیده

فاکتورهای محیطی مختلفی مثل عفونت ها باعث ایجاد بیماری آلزایمر می شوند. مطالعات نشان داده اند که ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ و سیتومگالوویروس با بیماری آلزایمر ارتباط دارند. سیتومگالوویروس انسانی باعث ایجاد عفونت در سیستم عصبی مرکزی می شود. مطالعه ای نیاز بود که به بررسی ویروس های مختلف در بیماران آلزایمری بپردازد. این مطالعه برای اولین بار به بررسی ویروس های مختلف در بیماران آلزایمری می پردازد. در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا به آلزایمر مورد مطالعه قرار گرفته و نمونه های خون (۱/۵ میلی لیتر) گرفته شد. بعد از جداسازی DNA ویروسی، نمونه ها توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده های مربوط به افراد با نتایج مولکولی مثبت توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و تست Kruskal-Wallis تحلیل شدند. شیوع سیتومگالوویروس، HSV1، HSV2 به ترتیب در ۲۷، ۸ و ۴ فرد مشاهده شد که برابر با ۲۷٪، ۸٪ و ۴٪ بود. در مجموع هر سه ویروس در بیماران شناسایی شدند، ولی فراوانی سیتومگالوویروس در بیماران بیشتر بود. این نتایج پیشنهاد می کنند که عفونت های سیتومگالوویروس ها همبستگی با افزایش احتمال بیماری آلزایمر و نرخ سریع کاهش شناخت در جمعیت مسن دارد.

واژه های کلیدی: هرپس سیمپلکس، سیتومگالوویروس، آلزایمر، شیوع

مقدمه

این مطلب نشان می دهد که عفونت ویروسی ممکن است در بیماری آلزایمر درگیر شود (۳). مطالعات اخیر نشان داده اند که عفونت های هرپس ویروسی ممکن است باعث تولید آمیلوئید بتا و رسوب آن در مغز می شوند (۴). الیگومرهای بتا آمیلوئیدی ممکن است با گلیکوپروتئین های سطح هرپس ویروس ها باند شوند (۵)، که این کار از طریق پوشش محافظتی HSV1 و HHV6 می باشد. مطالعات نشان داده اند که عفونت با هرپس ویروس ها باعث ایجاد پلاک آمیلوئیدی در موش های ترانس ژنیک می شود (۵). خصوصیات بافت شناسی بیماری آلزایمر بیشتر مربوط به رسوب خارج سلولی بتا آمیلوئیدها و رسوب

بیماری آلزایمر، بیماری است که سالیانه افراد زیادی را درگیر خود می سازد و علت آن ناشناخته می باشد. گزارش شده است که حدود ۴۶/۸۰ میلیون نفر حالت دیوانگی دارند و انتظار می رود که ۷۴/۷۰ و ۱۳۱/۵۰ میلیون نفر با آن در سال های ۲۰۳۰ و ۲۰۵۰ به ترتیب با آن درگیر شوند (۱). برای دهه ها این فرضیه مطرح شد که میکروب ها ممکن است عامل بیماری آلزایمر باشند (۲). حدود ۳۰ سال پیش، محققین در ایالت متحده یافتند که میزان DNA ویروس هرپس سیمپلکس ۱ انسانی در مغز افراد مرده ی آلزایمری بسیار بیشتر از مغز افراد سالم بود،

داده‌اند (۱۳). هدف این مطالعه بررسی فراوانی ویروس‌ها؛ مختلف در افرادی با بیماری آلزایمر بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ بیمار با آلزایمر مورد مطالعه قرار گرفتند و نمونه‌های خون (۱/۵ میلی لیتر هر نفر) گرفته شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد واحد شهر قدس انتقال یافتند. قبل از گرفتن نمونه‌های خون، بیماران از مطالعه اطلاع یافتند و رضایت نامه‌ها را امضاء کردند. ویژگی‌های جمعیتی شناختی شاما سن و جنس بیماران ثبت شد. نمونه‌های سرم در دم؛ ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان جداسازی DNA ویروسی قرار گرفتند. بعد از جداسازی DNA ویروسی نمونه‌ها توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز انجام شد. سپس، DNA استخراج شده در بافر و در فریز در دم؛ ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سه جفت پرایم اختصاصی برای HSV1, HSV2 و سیتومگالوویروس استفاده شدند، همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شد است (۱۴).

داخل سلولی پروتئین تاو در یک ساختار هایپرفسفریله می‌باشد که باعث تخریب سیناپسی و کاهش عملکرد شناختی می‌شوند (۶). در افرادی با نقص سیستم ایمنی، ویروس در خون تشخیص داده می‌شود، ولی اگر فعالیت ویروس تداوم یابد، آن می‌تواند در بخش‌هایی همانند ادرار، بزاق، منی، ترشحات واژنی و شیر یافت می‌شود (۷،۸). کاهش بیان مولکول‌های CD27 و CD28 با افزایش بیان CD57 در افرادی با ویروس‌هاس هرپس مشاهده می‌شود که باعث افزایش ترشح انترفرون گاما و فاکتور نکروزی تومور آلفا می‌شوند (۹). این سیتوکین‌ها باعث رسوب پپتیدهای آمیلوئیدی می‌شوند که مارکری برای بررسی بیماری آلزایمر می‌باشد و این فرضیه را مطرح می‌سازد که التهاب نقش مهمی در پیشرفت بیماری آلزایمر بازی می‌کند (۱۰). سیتومگالوویروس انسانی باعث ایجاد عفونت در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. پاسخ پیش التهابی به عفونت این ویروس در سیستم عصبی مرکزی باعث پیشرفت بیماری پیشرونده‌ی عصبی همانند آلزایمر می‌شود (۱۱). مطالعات نقش ویروس سیمپلکس هرپس ۱ را در بیماری آلزایمر پذیرفته‌اند، زیرا این ویروس سیستم عصبی مرکزی را عفونی می‌کند و باعث ایجاد عفونت‌های پنهانی می‌شود که مکرراً فعال می‌شوند (۱۲). این مطالعات تشخیص DNA ویروس را با تجمع پروتئین‌های غیرنرمال مرتبط با آلزایمر در سیستم عصبی مرکزی نشان

جدول ۱ - پرایمرهای مورد استفاده برای ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ و سیتومگالوویروس.

Target gene	Product size (bp)	Primer Sequence	irus
Glycoprotein D	147	H1F 5-TGGGACACATGCCTTCTTGG-3 CCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC-3	ISV-1
Glycoprotein D	227	H2F 5-GTACAGACCTTCGGAGG-3 H2R 5-CGCTTCATCATGGGC-3	ISV-2
IRL 11	256	CMF 5-GTACACGCACGCTGGTTACC-3 CMR 5-GTAGAAAGCCTCGACATCGC-3	IMV

شد. برای اطمینان از اختصاصیت محصولات واکنش زنجیره‌ی پلیمرز، دو نمونه از DNA از محصول CR برای هر ویروس توالی‌یابی شد که تعیین‌کننده‌ی هویت ویروس‌ها توسط نرم افزار بیوانفورماتیک و بانک ژن بود.

نتایج

مشخصات دموگرافیک

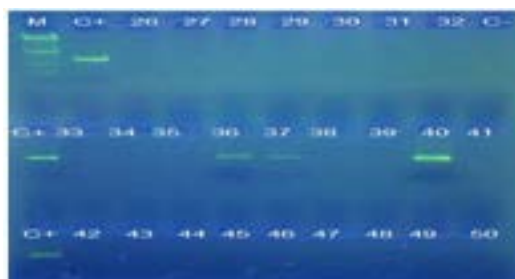
ویروس‌های HSV1, HSV2 در یک محیط RMPI در یک لاین سلولی VERO از مؤسسه پاستور تهیه شدند. سیتومگالوویروس از سرم و با یک تیتراژ اختصاصی تهیه شد. روش PCR در یک مسترمیکس با استفاده از پرایمرها و ژنوم ویروس‌ها انجام شد. نتایج بر روی یک آگارز ژل ۲ درصد که روی سایبر ایمن رنگ آمیزی شده بود، رنگ آمیزی شد و با نتایج با DNA ladder مقایسه

آزمون PCR برای HSV1, HSV2 و سیتومگالوویروس به- ترتیب در شکل های یک تا ۳ آورده شده است. نتایج نشان می دهد که شیوع سیتومگالوویروس در مقایسه با دو نوع ویروس دیگر بیشتر می باشد، ولی شیوع HSV1, HSV2 در بیمارانی با آلزایمر پیشرفته بیشتر مشاهده شد. علائم آلزایمر در بیمارانی با نمونه های مثبت HSV1, HSV2 به طور قابل توجهی بزرگتر بود. این نتایج نشان می دهد که ویروس های HSV با شدت آلزایمر مرتبط می باشد.

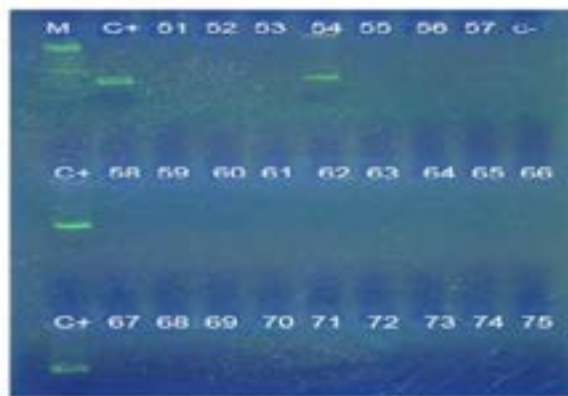
افراد مورد مطالعه شامل ۵۳ مرد و ۴۷ زن بودند. میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۷۰/۷۲ سال با انحراف معیار ۷ سال بود. دوره ی بیماری برای افراد مورد مطالعه ۱۰/۳۴ ماه با انحراف معیار ۷/۲۳ بود.

نتایج آزمون PCR

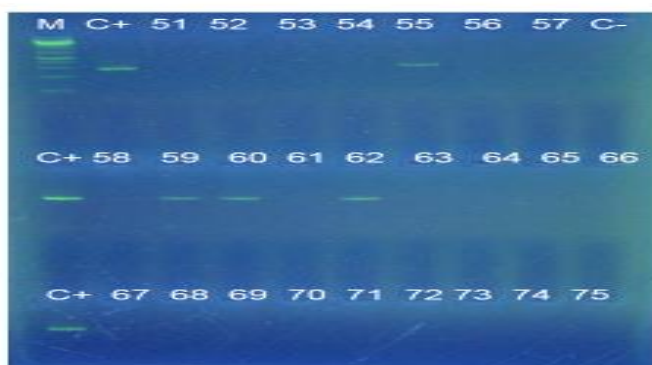
کنترل های مثبت و منفی برای هر ژن در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج به دست آمده شیوع سیتومگالوویروس، HSV1, HSV2 به ترتیب در ۲۷، ۸ و ۴ فرد مشاهده شد که برابر با ۲۷٪، ۸٪ و ۴٪ بود. نتایج



شکل ۱ - نتایج آزمون PCR برای نمونه های HSV-1. C+ برای کنترل مثبت، C- نمونه های کنترل منفی و نمونه های ۳۶، ۳۷ و ۴۰ نمونه های مثبت.



شکل ۲ - نتایج آزمون PCR برای نمونه های HSV-2. C+ برای کنترل مثبت، C- نمونه های کنترل منفی و نمونه ی ۵۴ نمونه ی مثبت.



شکل ۳ - نتایج آزمون PCR برای نمونه‌های سیتومگالوویروس. C+ برای کنترل مثبت، C- نمونه‌های کنترل منفی و نمونه‌های ۵۵، ۵۹، ۶۰ و ۶۲ به‌عنوان نمونه‌های مثبت.

بحث و نتیجه گیری

سالیان طولانی است که محققین پذیرفته‌اند که میکروارگانسیم‌ها می‌توانند نقش مهمی در پیشرفت بیماری‌های مختلف همانند آلزایمر داشته باشند. نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد که از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه، در ۳۹ بیمار نمونه‌های برای ویروس‌های مختلف مثبت بودند. بیشترین نمونه‌ها برای سیتو مگالو ویروس و کمترین نمونه‌ها برای هرپس سیمپلکس ویروس ۱ مشاهده شد. این نتایج می‌پذیرد که احتمالاً بین ویروس‌های مختلف با بیماری آلزایمر ارتباط قابل توجهی وجود دارد. هرپس ویروس‌ها معمولاً در افرادی مشاهده می‌شود که سطح پیشرفته‌ای از بیماری آلزایمر را داشته باشند. مطالعات نشان داده‌اند که آنتی بادی‌های تولیدی علیه هرپس سیمپلکس ویروس ۱ می‌توانند نقش دفاعی را علیه اختلال پیشرونده‌ی ویروسی داشته باشند (۱۵). نتایج این مطالعه نشان داد که سیتومگالوویروس شیوع بیشتری داشت. سیتومگالوویروس در افراد مسن‌تر بیشتر مشاهده می‌شود و با مرگ و میر و بیماری‌های قلبی-عروقی بیشتر مرتبط می‌باشد (۱۵). این ویروس از شخصی به شخص دیگر توسط تماس با مایعات بدن انتقال می‌یابد. نرخ شیوع این ویروس با افزایش سن و پیرتر شدن افزایش می‌یابد. در یک مطالعه‌ی گذشته نگر روی نرخ شیوع ویروس‌ها، نشان داده شد که شیوع سیتومگالوویروس تقریباً ۶۰٪ می‌باشد که میزان آن ۳۶٪ در کودکان و ۹۰٪ در افراد بالای ۸۰ سال بود (۱۶). این نتایج تا حدودی

همخوان با یافته‌های این مطالعه می‌باشد که نشان داد شد، شیوع سیتومگالوویروس را ۲۷ درصد در افراد ۰ ساله مشاهده شد. نتایج همچنین ارتباطاتی بین هرپس ویروس و شیوع آلزایمر نشان داد. این نتایج نشان داد که شیوع هرپس ویروس‌ها در مقایسه با سیتومگالوویروس پایین‌تر می‌باشد ولی با این‌حال در افرادی با آلزایم خصوصاً آلزایمر پیشرفته مشاهده می‌شوند. مطالعات اخیر شواهدی را فراهم کرده‌اند که نشان می‌دهد هرپس سیمپلکس ۱ در مغز با بیماری زایی آلزایمر مرتبط می‌شود (۱۷). سازوکار هرپس سیمپلکس ویروس‌ها به این صورت می‌باشد که این ویروس‌ها با دیگر عوامل پیش برنده‌ی بیماری تعامل می‌کنند و باعث پیشرفت بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی می‌شوند (۱۸). این مشاهدات نشان می‌دهد که پاتوژن‌ها ممکن است نقش مهمی در توسعه و پیشرفت بیماری آلزایمر را داشته باشند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که تعاملات بین ب‌آمیلوئیدها و پروتئین‌های هرپس ویروس باعث ایجاد آلزایمر می‌شود (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر، گزارش شد که پلی مورفیسیم‌های تک نوکلئوتیدی در ترکیب با دیگر عوامل ژنتیکی ممکن است بخش‌های آنتی ویروسی حذف نماید و باعث افزایش حساسیت به هرپس ویروس می‌شود (۱۴). دیگر محققین توضیح داده‌اند که سازوکارهای سلولی که با افزایش تولید بتا-آمیلوئید عفونت هرپس ویروسی در موش رخ می‌دهد، که این که به‌علت رشد عفونت‌های سلولی می‌باشد (۱۷). در مجمو

آلزایمری روش‌های مختلفی برای کنترل آن‌ها به‌کار گرفته شود.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی واحد شهر قدس قدردانی می‌گردد.

نتایج این مطالعه می‌پذیرد که احتمالاً ویروس‌ها در بیماری آلزایمر درگیر می‌شوند.

در مجموع، بیان ویروس‌های مرتبط با آلزایمر در برخی از بیماران مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که هرپس ویروس‌ها و سیتومگالوویروس‌ها نقش قابل توجهی در پیش‌برد بیماری دارند و لازم است که در افراد

منابع مورد استفاده

1. Fulop, T., Witkowski, J. M., Bourgade, K., Khalil, A., Zerif, E., Larbi, A., Hirokawa, K., Pawelec, G., Bocti, C.H., Lacombe, G., Dupuis, G., Frost, E. H., 2018. Can an infection hypothesis explain the beta amyloid hypothesis of alzheimer's disease? *Front Aging Neurosci* 10: 224.
2. Rizzo, R., 2020. Controversial role of herpesviruses in Alzheimer's disease. *PLoS Pathogenes* 16(6): e1008575.
3. Itzhaki, R. F., Lin, W. R., Shang, D., Wilcock, G. K., Faragher, B., Jamieson, G. A., 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349(9047): 241-244.
4. Eimer, W. A., Vijaya Kumar, D. K., Navalpur Shanmugam, N. K., Rodriguez, A. S., Mitchell, T., Washicosky, K. J., 2018. Alzheimer's disease-associated beta-amyloid is rapidly seeded by herpesviridae to protect against brain infection. *Neuron* 99(1): 56-63.
5. Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., 2010. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5(3): e9505.
6. Sayed Sartaj, S., Mohd, S., Ashraf, A., Mohammad Amjad, K., Azamal, H., Fahim, A., Esam, I. A., Nigel, H. G., 2018. Role of viruses, prions and miRNA in neurodegenerative disorders and dementia. *Indian Virol Society* 29: 419-433.
7. Moss, P., 2010. The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly. *Current Opin Immunol* 22: 529-534.
8. Murata, H., Nii, R., Ito, M., Ihara, T., Komada, Y., 2009. Quantitative detection of HCMV-DNA in saliva from infants and breast milk on real-time polymerase chain reaction. *Pedestrian Int* 51: 530-534.
9. Derhovanesian, E., Maier, A. B., Hahnel, K., Robert, B., deCraen, A. J. M., Slagboom, E. P., Westendorp, R. G. J., Pawelec, G., 2011. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol* 92: 2746-2756.
10. Almanzar, G., Schwaiger, S., Jenewein, B., Keller, M., Herndler-Brandstetter, D., Wurzner, R., Schonitzer, D., Grubeck-Loebenstien, B., 2005. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol* 79: 3675-3683.
11. Blasko, I., Knaus, G., Weiss, E., Kemmler, G., Winkler, C., Falkensammer, G., Griesmacher, A., Wurzner, R., Marksteiner, J., Fuchs, D., 2007. Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin. *J Psychiatr Res* 41: 694-701.
12. Alvarez, G., Aldudo, J., Alonso, M., Santana, S., Valdivieso, F., 2012. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res* 90: 1020-1029.
13. Wozniak, M. A., Frost, A. L., Preston, C. M., Itzhaki, R. F., 2011. Antivirals reduce the formation of key Alzheimer's disease molecules in cell cultures acutely infected with herpes simplex virus type 1. *PLoS One* 6: e25152.
14. Licastro, F., Porcellini, E., 2016. Persistent infections, immune-senescence and Alzheimer's disease. *Oncoscience* 3(5-6): 135-142.
15. Itzhaki, R. F., 2018. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: possible mechanisms and signposts. *The FASEB Journal* 31: 3216-3226.
16. Barnes, L., Capuano, A., Aiello, A., Turner, A., Yolken, R., Torrey, E. F., Bennett, D., 2015. Cytomegalovirus infection and risk of Alzheimer's disease in older black and white individuals. *J Infection Dis* 211: 230.
17. Itzhaki, R. F., Herpes and Alzheimer's disease: Subversion in the central nervous system and how it might be halted. *J Alzheimer's Dis* 54: 3713-3721.
18. Gholamzadeh, S., Heshmati, B., Mani, A., Petramfar, P., Bagheri, Z., 2017. The

prevalence of Alzheimer's disease; its risk and protective factors among the elderly population in Iran. Shiraz E-Medical J 18(9): e57576.

19. Baringer, J. R., Pisani, P., 1994. Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction. Ann Neurol 36: 823-829.