

HHV-6 un HHV-7 asociācija ar Gijēna-Barē sindromu Association of HHV-6 and HHV-7 with Guillain-Barre Syndrome

Zaiga Nora, Ilga Ķikule¹, Svetlana Čapenko, Ināra Logina²,
Modra Murovska

LU Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūts
Rātsupītes iela 1a, Rīga, LV-1067
E-pasts: znora@one.lv

¹ Bērnu klīniskā universitātes slimnīca
Vienības gatve 45, Rīga, LV-1004
E-pasts: ilga.k@one.lv

² Rīgas Stradiņa universitāte
Dzirciema iela 16, Rīga, LV-1007
E-pasts: logini@navigator.lv

Ir daudz neskaidrību par etioloģiskiem un citiem faktoriem, kas ietekmē hronisku iekaisīgu un autoimūnu slimību klīnisko gaitu. Dažu pēdējo gadu laikā liela uzmanība tiek pievērsta β-herpesvīrusiem, parādot, ka tie ir iesaistīti iekaisīgu un autoimūnu CNS un PNS slimību attīstībā. Ļoti maz ir zināms par šo vīrusu klīnisko ietekmi uz Gijēna-Barē sindromu – akūtu iekaisīgu demielinizējošu polineuropātiju, kuras etioloģija un patoģenēze vēl aizvien pilnībā nav skaidra.

Mērķis. Noteikt iespējamo β-herpesvīrusu HHV-6 un HHV-7 asociāciju ar GBS.

Pacienti un metodes. Pētījumā bija iekļauti 30 pacienti (16 vīrieši, 14 sievietes; vidējais vecums 41 gads), kuriem slimība diagnosticēta pēc vispārpieņemtiem *Asbury A. K.* un *Cornblath D. R.* klīniskajiem kritērijiem un 150 asins donori (73 vīrieši, 77 sievietes; vidējais vecums 37 gadi) kā kontroles grupa. Latenti persistējoša un aktīva HHV-6 un HHV-7 infekcija bija diagnosticēta ar polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimēšanu (nPCR), izmantojot DNS, kas izolēta no PBL un plazmas. Vīrusālās mRNS klātbūtne PBL bija diagnosticēta ar RT-PCR.

Rezultāti. PBL DNS 11 (36,6%) pacientiem konstatēja HHV-6 un 26 (86,6%) pacientu PBL DNS – HHV-7 genoma secību klātbūtni. Statistiski ticama atšķirība latenti persistētējošas vīrusu infekcijas biežuma ziņā starp izmeklētajām grupām netika novērota.

HHV-6 genoma sekvenču asins plazmas DNS atrada 3/11 (27,2%) pacientiem, savukārt neatrada nevienam no asins donoriem ($p < 0,05$), HHV-7 genoma sekvenču asins plazmas DNS – 11/26 (42,3%) pacientiem un 12/113 (10,6%) asins donoriem ($p < 0,05$). Nevienā no paraugiem vīrusa mRNS transkripciju nekonstatēja, kas apstiprina, ka vīruss patiešām ir latentā stāvoklī.

Secinājumi. Tika parādīts, ka HHV-7 un HHV-6 ir zināma nozīme GBS etiopatogēnēzē, taču, lai pilnībā izprastu vīrusu un slimības mijiedarbību, ir jāturpina iesaītie pētījumi, jo GBS ir neiromuskulāras paralīzes visbiežākais cēlonis.

Atslēgvārdi: HHV-6, HHV-7, latenti persistējoša infekcija, aktīva infekcija, GBS.

Key words: HHV-6, HHV-7, latent/persistent infection, active infection, GBS.

Ievads

Gijēna-Barē (*Guillain-Barre*) sindroms (GBS) jeb akūta iekaisīga demielinizējoša polineuropātija ir perifērās nervu sistēmas slimība ar difūzu tās elementu bojājumu. Tā ir autoimūna patoloģija, kuras dēļ rodas imūna iekaisuma izraisīts nervu un saknīšu mielīna apvalku sabrukums jeb demielinizācija un arī aksonu funkcijas traucējums. Tiek uzskatīts, ka galvenais demielinizācijas process notiek pēc T-limfocītu medītētās šūnu citotoksiskās hipersensibilizācijas reakcijas neadekvātas imūnās atbildes dēļ. Fakts, ka lielākajai daļai pacientu vienu līdz trīs nedēļas pirms GBS simptomu parādīšanās ir bijusi vīrusinfekcija (parasti respiratora vai kuņģa–zarnu trakta, kā arī CMV un EBV), liek piekrist šai domai [1]. Arī *Campylobacter jejuni* un *Mycoplasma pneumoniae* tiek uzskatītas par vienu no galvenajiem GBS izraisošajiem faktoriem [2]. GBS tiek uzskatīts par biežāko akūtas šļauganas paralīzes cēloni mūsdienās. GBS progresē strauji, klīniskie simptomi var būt dažādi, taču parasti slimība sākas ar muskuļu vājumu, kas variē no viegli izteiktas vājuma sajūtas kājās un rokās līdz totālai ekstremitāšu paralīzei; no plauktu vai pēdu distālo daļu tirpšanas līdz refleksu zudumam. 40% GBS slimnieku ir elpošanas muskuļu paralīze, arī sirds un asinsvadu sistēmas darbība var būt traucēta [2]. Ar GBS parasti slimo 50–74 gadu vecumā, vīrieši biežāk nekā sievietes, taču ir gadījumi, kad saslimst ļoti jauni cilvēki un pat jaundzimušie [3].

Lai gan ir zināmi dati par atsevišķu infekciozo aģentu nozīmi GBS patoģenēzē, tomēr ir maz informācijas par vīrusu nozīmi tā izcelsmē un norisē, jo vēl aizvien slimības etioloģija un patoģenēze nav pilnībā izpētīta. Pēdējo gadu laikā liela uzmanība ir pievērsta β-herpesvīrusiem (CMV, HHV-6, HHV-7), parādot, ka tie ir iesaistīti iekaisīgu un autoimūnu centrālās (CNS) un perifērās (PNS) nervu sistēmas slimību etiopatogēnēzē.

Lai noteiktu iespējamo saistību starp HHV-6, HHV-7 un GBS, bija salīdzināta vīrusu genoma secību klātbūtne PBL (*peripheral blood leukocytes*) DNS un asins plazmas DNS, kā arī vīrusu specifiskās mRNS transkripcija PBL latentējoši inficētiem pacientiem.

Materiāli un metodes

Pacienti un kontroles grupa. Pētījumā bija iekļauti 30 pacienti (16 vīrieši, 14 sievietes; vidējais vecums 41 gads) ar GBS. Slimība diagnosticēta pēc vispārpieņemtiem *Asbury A. K. un Cornblath D. R.* klīniskajiem kritērijiem [12]. Perifērās nervu sistēmas bojājums visiem tika apstiprināts ar nervu elektriskā impulsa vadāmības izmeklējumiem – neirogrāfiski un elektromiogrāfiski, izmantojot *Keypont* (Dānija) iekārtu. Kontroles grupā bija 150 asins donori (77 sievietes un 73 vīrieši; vidējais vecums 37 gadi) [4]. Pētījumi bija veikti ar AML/RSU Ētikas komisijas atļauju, un visi pētījuma dalībnieki bija devuši piekrišanu izmeklējumiem.

Metodes. DNS izolēja no PBL ar fenola, hlороforma metodi un no asins plazmas ar *QIAamp Blood Kit* (*Qiagen GmbH*, Vācija) palīdzību. Izdalītās DNS kvalitāti pārbaudīja, izmantojot β-globīna PCR [5]. Lai noteiktu HHV-6 un HHV-7 genoma sekvenču klātbūtni PBL DNA un asins plazmas DNA, izmantoja polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimēšanu – *nested PCR* (nPCR). HHV-6 DNS detekciju veica, kā aprakstīts *Bandobashi et al.* [6], lietojot praimerus, kas ir komplementāri kapsīda

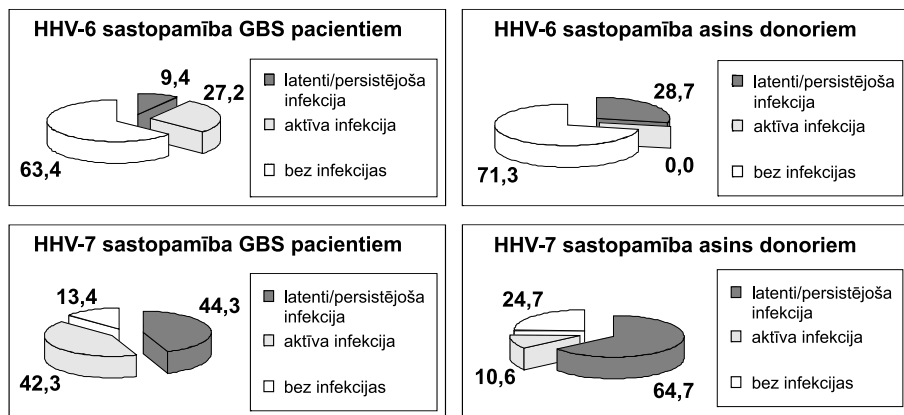
galvenos proteīnus kodējošam gēnam un kas atpazīst abus vīrusa variantus (A un B). HHV-7 detekciju veica, kā aprakstīts *Berneman et al.* [7], ar praimeru komplektu, kas ir komplementāri U10 gēnam. PCR produktus vizualizēja un analizēja ar *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290, ASV*. Papildus izmantoja arī reversās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakciju (RT-PCR), lai noteiktu HHV-6 un HHV-7 mRNS transkripciju, izmantojot *MBI Fermentas* (Lietuva) reaģentus.

HHV-6 un HHV-7 infekcijas izplatības statistiskās atšķirības starp izmeklētajām grupām noteica, izmantojot *Fisher's Exact* testu, un rezultāts tika uzskatīts par ticamu, ja $p \leq 0,05$.

Rezultāti

Lietojot nPCR, bija noteikta vīrusu genoma secību klātbūtne DNS, kas izdalīta no PBL un plazmas pacientiem ar GBS un arī asins donoriem, kurus izmantoja kā kontroles grupu. HHV-6 genoma sekvenci atrada 11 (36,6%), savukārt HHV-7 genoma sekvenci – 26 no 30 (86,6%) GBS slimnieku DNA, kas izolēts no PBL. Tas liecina par latenti persistējošu vīrusu infekciju. HHV-6 latenti persistējošu infekciju konstatēja 43 (28,7%) un HHV-7 – 113 (75,3%) asins donoriem. Statistiski ticama atšķirība latenti persistējošas vīrusu infekcijas biežuma ziņā starp izmeklētajām grupām netika novērota.

HHV-6 genoma secību klātbūtni asins plazmas DNS, kas liecina par aktīvu vīrusu infekciju, konstatēja 3/11 (27,2%), savukārt HHV-7 genoma secības asins plazmas DNS – 11/26 (42,3%) pacientiem. Attiecīgi asins donoriem aktīvu HHV-6 infekciju neatrada 0/43 ($p < 0,05$), bet HHV-7 aktīvu infekciju konstatēja 12/113 (10,6%; $p < 0,05$) indivīdiem (sk. 1. att.).



1. att. HHV-6 un HHV-7 latenti persistējošas un aktīvas infekcijas sastopamība GBS pacientiem un asins donoriem (%)

Lai pārliecinātos, vai nenotiek agrīna vīrusa aktivācija tajos latentās infekcijas gadījumos, kur vīruss netiek konstatēts asins plazmā, no GBS slimnieku PBL paraugiem bija izolēta RNS un ar RT-PCR palīdzību noteikta HHV-6 un HHV-7 specifiskās mRNS transkripcija. Nevienā no paraugiem vīrusa mRNS transkripciju nekonstatēja. Tas apstiprina, ka vīruss patiešām ir latentā stāvoklī.

Diskusija

Iegūtie rezultāti parādīja, ka GBS slimniekiem biežāk novēro HHV-7 nekā HHV-6 aktivāciju. Tas ir interesants fakts, jo līdz šim citas pētnieku grupas ir pievērsušas uzmanību tikai HHV-6 un CMV infekcijas iespējamai nozīmei GBS etiopatogēnēzē. Arī par šo vīrusu saistību ar slimības izcelsmi un gaitu ir pretrunīgi viedokļi. Ir darbi, kuros teikts, ka HHV-6 varētu būt saistīts ar GBS [10], taču ir arī tādi rezultāti, kas noliedz jebkādu HHV-6 saistību ar šo slimību [11].

Gan mūsu veiktie pētījumi, gan arī citās valstīs iegūtie pētījumu rezultāti parāda HHV-6 asociāciju ar centrālās nervu sistēmas iekaisīgu demielinizējošu slimību – multiplo sklerozi (MS) [12]. Ir parādīta ne tikai HHV-6 asociācija ar MS, bet arī HHV-6 aktivācijas saistība ar slimības aktīvo fāzi. Šie rezultāti ļauj domāt, ka HHV-6 ir būtiska nozīme demielinizējošu procesu attīstībā, taču, ņemot vērā HHV-6 un HHV-7 lielo ģenētisko līdzību un to, ka abi šie vīrusi spēj replicēties viena tipa šūnās, t. i., CD34+ šūnās, nevar izslēgt arī HHV-7 saistību ar autoimūnu un demielinizējošu procesu. Par to liecina arī šajā darbā iegūtie rezultāti, kas parāda, ka akūtas iekaisīgas demielinizējošas perifērās nervu sistēmas slimības – GBS – gadījumā biežāk aktivējas tieši HHV-7. Rodas jautājums, kāpēc CNS demielinizējošos procesos vairāk iesaistīts ir HHV-6, bet PNS demielinizējošos procesos – HHV-7, ņemot vērā, ka abas (MS un GBS) ir autoimūnas slimības. Lai rastu atbildi uz šo jautājumu, izmeklētie pacienti būtu jāpārbauda atkārtoti dinamiskā, lai novērtētu vīrusu savstarpējo mijiedarbību, jo zināms, ka vispirms aktivējas HHV-7 un pēc tam HHV-6 un CMV. Varbūt tieši tāpēc GBS gadījumā biežāk ir diagnosticēta tieši HHV-7 aktivācija, atkārtotos izmeklējumos ir varbūtēja iespēja diagnosticēt arī HHV-6 aktīvu infekciju, taču šī tēze jāpārbauda, kaut gan klīniski PNS demielinizējošas slimības transformāciju CNS demielinizējošā procesā novēro reti. Ja aplūko MS un HHV-6 mijiedarbību, var rasties jautājums, kāpēc šeit aktīva HHV-7 infekcija tiek novērota retāk nekā aktīva HHV-6 infekcija. Jāatzīst, ka MS slimnieku vidū ir tādi gadījumi, kad konstatē HHV-6 un HHV-7 vienlaicīgu aktivāciju. Tas parāda, ka arī CNS demielinizējošos procesos ir iesaistīts HHV-7. Ņemot vērā MS slimības norises īpatnības – tās atkārtotos paasinājumus jeb relapses, ļoti iespējams, ka vīrusu savstarpējās mijiedarbības mehānismi ir izmainīti un GBS gadījumā tie atšķiras. Diskutējams arī jautājums par akūtas demielinizējošas PNS saslimšanas – GBS – pāreju tālākā hroniskā iekaisīgā polineuropātijā un cilvēka herpētisko vīrusu (HHV-6 un HHV-7) savstarpējo mijiedarbību.

Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka HHV-7 un HHV-6 ir zināma nozīme GBS etiopatogēnēzē, taču, lai pilnībā izprastu vīrusu un slimības mijiedarbību, ir jāturpina iesāktie pētījumi, jo GBS ir neiromuskulāras šļauganas paralīzes biežākais cēlonis. Apmēram ¼ daļai slimnieku tas rada ievērojamas sekas, invaliditāti, un 9% gadījumu slimība beidzas nelabvēlīgi.

LITERATŪRA

1. Linda L., Sulston R. N. *Meeting the Challenge of Guillain-Barre Syndrome. Nursing Management*, 2002, 33(7), pp. 25–30.
2. *NAID Workshop, Development of Guillain Barre Syndrome Following Campylobacter Infection*. Natcher Conference Center, NIH Bethesda, MD, USA August 26–27, 1996.
3. <http://www.pubmed>, Guillain-Barre Syndrome, 2003.

4. Kozireva S., Nemceva G., Danilāne I., Pavlova O., Blomberga J., Murovska M. *Prevalence of Blood-Borne Viral Infections (Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, Human Herpesvirus-7, Human Herpesvirus-8, Human T-Cell Lymphotropic Virus-I/II, Human Retrovirus-5) Among Blood Donors in Latvia*. *Ann Hematol.*, 2001, 80, pp. 669–673.
5. Vandamme A. M., Fransen K., Debaisieux I., et al. *Standardization of Primers and an Algorithm for HIV-1 Diagnostic PCR Evaluated in Patients Harboring Strains of Diverse Geographical Origin*. *J. Virol. Methods*, 1995, 51, pp. 305–316.
6. Bandobashi K., Diabata M., Kamioka M., et al. *Human Herpesvirus 6 (HHV-6)-Positive Burkitt's Lymphoma: Establishment of a Novel Cell Line Infected with HHV-6*. *Blood*, 1997, 90, pp. 1200–1207.
7. Berneman Z. N., Ablashi D. V., Li G., et al. *Human Herpesvirus 7 is a T-Lymphotropic Virus and is Related to, but Significantly Different from, Human Herpesvirus 6 and Human Cytomegalovirus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, pp. 10552–10556.
8. Boutolleau D., Fernandez C., Andre E., et al. *Human Herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: Two Closely Related Viruses with Different Infection Profiles in Stem Cell Transplantation Recipients*. *J. of Infectious Diseases*, 2003, 187, pp. 179–189.
9. Mirandola P., Sechiero P., Pierpaoli S., et al. *Infection of CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells by Human Herpesvirus 7 (HHV-7)*. *Blood*, 2000, 96, pp. 126–131.
10. Merelli E., Sola P., Faglioni P., et al. *Newest Human Herpesvirus (HHV-6) in the Guillain-Barre Syndrome and Other Neurological Diseases*. *Acta Neurol. Scand.*, 1992, 85(5), pp. 334–336.
11. Wilborn F., Schmidt C. A., Brinkmann V., et al. *A Potential Role for Human Herpesvirus Type 6 in Nervous System Disease*. *J. Neuroimmunol.*, 1994, 49 (1–2), pp. 213–214.
12. Asbury A. K., Cornblath D. R. (1990). *Assessment of Current Diagnostic Criteria for Guillain-Barre Syndrome*. *Ann Neurol* 27 (Suppl.): S21–24.
13. Chapenko S., Millers A., Nora Z., Logina I., Kukaine R., Murovska M. *Correlation Between HHV-6 Reactivation and Multiple Sclerosis Disease Activity*. *J. Med. Virol.*, 2003, 69(1), pp. 111–117.

Summary

Background: There are many uncertainties concerning the etiological and other factors determining the clinical course of chronic inflammatory and autoimmune diseases. Viral infections can be one of them responsible for the onset and sustaining of these processes. During the last few years much attention had been paid to the beta-herpesviruses demonstrating that they are involved in the development of inflammatory and autoimmune diseases of CNS and PNS. Very little is known about these viruses in clinical manifestation of Guillain-Barre Syndrome (GBS) -an acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, the etiology and pathogenesis of which is still incompletely understood.

Aim: To evaluate the implication of human β -herpesviruses HHV-6, HHV-7 in acute inflammatory processes in patients with GBS.

Patients and methods: 30 patients (16 men, 14 women; mean age 41 years) who fulfilled the diagnostic criteria for GBS and 150 blood donors (73 men, 77 women; mean age 37 years) as a control group were included in this observation.

Latent/persistent and active HHV-6 and HHV-7 infections were detected by nested PCR using PBL and plasma DNA as the templates, respectively. Presence of viral mRNA in PBL was examined by RT-PCR.

Results: PBL DNA of 11 (36.6%) patients showed the presence of HHV-6 genomic sequence and DNA of 26 (86.6%) patients the presence of HHV-7 genomic sequence. No statistic difference between the incidence of latent/persistent HHV-6 and HHV-7 infections in patients with GBS and control group was found. The presence of HHV-6 genomic DNA in plasma was shown in 3/11 (27.2%) patients (vs. 0/43 in blood donors, $p<0.05$), HHV-7 genomic sequence in plasma DNA – in 11/26 (42.3%) patients (vs. 12/113; 10.6% in blood donors, $p<0.05$). Conclusions: The correlation between HHV-6 and HHV-7 activation and GBS has been shown. An implication of all beta-herpesviruses in GBS pathogenesis could not be excluded.