

## TT ویروس در بیماران ایرانی مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون و گروه کنترل

دکتر آریتا حکمت دوست، دکتر طاهره غازیانی، فاطمه سادات استقامت، دکتر سید مؤید علویان،

دکتر حمید محقق شلمانی، دکتر محمد رضا زالی \*

\* مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

سابقه و هدف: TT ویروس یک DNA ویروس جدید می باشد که اولین بار در افرادی که بعد از تزریق خون دچار افزایش آنزیمهای کبدی شده بودند و از نظر سایر مارکرهای ویروسی منفی بودند، یافت شد. هنوز ارتباط این ویروس با بیماری خاصی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی نقش این ویروس در بیماران ایرانی مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون می باشد. مواد و روشها: سرم ۹۰ فرد مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون و ۹۰ نفر از پرسنل بدون سابقه بیماری کبدی، به روش *semi-nested PCR* نظر وجود TTV-DNA بررسی شد. یافته‌ها: TTV-DNA در ۱۰ مورد از بیماران (۱۱٪) و ۴ مورد از افراد گروه کنترل (۴/۴٪) مثبت بود، اما اختلاف معنی داری در دو گروه مشاهده نشد. همچنین TTV تأثیری بر تظاهرات بیماری نداشت. نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، اگرچه فراوانی TTV در بیماران بیش از گروه کنترل می باشد، ولی اختلاف بین دو گروه معنی دار نمی باشد. بنابراین، نتایج ما نقش قانع کننده ای برای TTV در پاتوژنز هیپاتیت اتوایمیون را تایید نمی کند. واژگان کلیدی: TT ویروس، هیپاتیت اتوایمیون.

### مقدمه

شیوع این ویروس در مناطق مختلف دنیا متفاوت گزارش شده است (۱۳). شیوع آن در جمعیت عمومی در مناطق مختلف به شرح زیر می باشد: انگلستان ۲٪، ایالات متحده آمریکا ۱۰-۱٪، ژاپن ۴۰٪، کره ۱۴٪، آلمان ۱۳٪، برزیل ۶۲٪، اسپانیا ۱۱٪، و کلمبیا ۱۰٪. با این حال هیچگونه اطلاعاتی درباره شیوع این بیماری در کشور ما وجود ندارد. در مناطقی که شیوع ویروس بالا می باشد، ممکن است افراد در اوایل زندگی مبتلا شوند. به عنوان مثال، در مطالعه ای که در ژاپن انجام شد، ۵٪ از ۱۹۷ کودک مورد مطالعه این ویروس را در سرم خود داشتند. در گزارش دیگری از جمهوری دموکراتیک کونگو این ویروس در ۶۱ نفر از ۱۰۵ خانم مراجعه کننده به درمانگاه و ۳۶ کودک از ۶۸ کودک آنها یافت شد. ویروس می تواند در مدفوع و صفرا بیماران مبتلا وجود داشته باشد. که مطرح کننده انتقال آن از طریق مدفوع می باشد. شیوع بالایی از عفونت با TT ویروس در بیمارانی که در معرض تزریق خون متعدد بوده اند، مشاهده

اگرچه پاتوژنز هیپاتیت اتوایمیون هنوز ناشناخته و مبهم می باشد، لیکن عوامل متعددی به عنوان عامل شروع کننده مطرح شده اند، به طوریکه در بررسیهای مختلف ویروس های هیپاتیت A، B و C (۴-۱)، ویروس سرخجه (۵)، و بعضی از داروها مانند نیتروفورانتوئین و مینوسیکلین (۱۰-۶) را در ایجاد این بیماری دخیل دانسته اند. ویروس منتقله از راه خون (TTV<sup>1</sup>) ویروس جدیدی است که در سال ۱۹۹۷ از سرم فردی در ژاپن که پس از انتقال خون دچار هیپاتیت شده بود، جدا شد (۱۱). این ویروس اولین ویروس از خانواده سیرکوویروسها<sup>۲</sup> است که در انسان به عنوان پاتوژن عمل می کند. این ویروس بدون پوشش، دارای ژنوم DNA تک رشته ای و حدود ۳۹۰۰ نوکلئوتید می باشد (۱۲).

<sup>1</sup> Transfusion Transmitted Virus

<sup>2</sup> Circovirus

شده است. به طوری که ۴۴٪ بیماران هموفیلی در انگلستان، تا ۷۵٪ در ژاپن، ۲۲٪ در چین و ۸۴٪ در ایتالیا با این ویروس آلوده شده‌اند (۱۳).

روش شناسایی ویروس در سرم از طریق جدا سازی DNA ویروس است (۱۲)، این در حالیست که اطلاعات کافی درباره پاسخ ایمنی بدن به ویروس وجود ندارد. شاید یافتن آنتی بادی TTV بتواند در این رابطه کمک کننده باشد. گزارش‌های اولیه در پیگیری طولانی مدت بیماران نشان داده است که میزان پاک شدن ویروس بسیار کم می باشد. به عنوان مثال در مطالعه ای آینده نگر پس از ۳ سال پیگیری بیماران دارای TTV، ۹۷٪ آنها هنوز ویروس را در سرم خود داشتند (۱۳).

به نظر می رسد در بیمارانی که همودیالیز می‌شوند شیوع این ویروس بالاتر باشد به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در ژاپن انجام گرفت، TTV در ۵۱٪ این بیماران مثبت بوده است که در مقایسه با گروه اهدا کننده خون سالم این میزان ۱۳٪ بوده است. میزان آنزیم‌های کبدی در هر دو گروه مشابه بوده است، اما این شیوع در فرانسه بسیار کمتر است به طوری که شیوع TTV در بیماران فرانسوی که همودیالیز می‌شدند تنها ۲٪ گزارش شده است (۱۳). به علاوه شیوع TTV به سال‌هایی که فرد تحت همودیالیز قرار می گیرد نیز بستگی دارد. تخمین زده می‌شود که در این بیماران میزان عفونت سالانه ۴٪ می‌باشد (۱۳).

در بیمارانی که پیوند کلیه شده‌اند نیز شیوع این ویروس بیشتر است. در مطالعه‌ای در ژاپن نشان داده شد ۲۵ نفر از بیماران پیوند شده (۳۶٪) از نظر این ویروس مثبت می‌باشند. سه نفر (۴٪) از این بیماران سطح آنزیم‌های کبدی بالایی داشتند که در ۲ نفر (۲/۸٪) از آنها بعد از مدت کوتاهی آنزیم‌ها طبیعی شدند. با این حال تاثیر نامطلوب بر روی ماندگاری پیوند گزارش نشده است (۱۳).

این ویروس در بیماران با هپاتیت حاد با علت نامشخص یافت شده است. اما یک ارتباط ثابت بین تیتراژ TTV و غلظت آنزیم‌های کبدی وجود ندارد. بنابراین مشخص نمی‌باشد که آیا ویروس علت هپاتیت بوده است یا همراهی آنها تنها یک یافته تصادفی می‌باشد. بعضی گزارشات مطرح کننده این موضوع هستند که در عده‌ای از بیماران ویروس منجر به هپاتیت حاد می‌گردد (۱۳).

با توجه به اینکه در بعضی مطالعات، TTV به عنوان عامل ایجادکننده هپاتیت‌های با علت نامشخص مطرح شده است و تاکنون مطالعه ای در این زمینه در ایران انجام نشده است،

تصمیم گرفتیم تا در این مطالعه نقش TTV در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت اتوایمیون را بررسی نماییم.

## مواد و روشها

این مطالعه به صورت مورد-شاهدی انجام شد. ۹۰ بیمار مبتلا به هپاتیت اتوایمیون که به صورت consecutive از خرداد ماه ۱۳۸۱ تا شهریور ۱۳۸۲ به مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش بیمارستان طالقانی ارجاع شده بودند، وارد مطالعه شدند. تشخیص هپاتیت اتوایمیون براساس سیستم نمره‌گذاری تشخیصی بین‌المللی در این بیماران تأیید شد. تنها بیمارانی با تیپ ۱ بیماری و دارای آنتی بادیهای ANA<sup>3</sup> و یا ASMA<sup>4</sup> وارد مطالعه شدند. پس از اخذ رضایت، نمونه‌های خون بیماران در هنگام مراجعه به درمانگاه جمع‌آوری شد. سرم بیماران در طی ۴ ساعت پس از خون‌گیری جداسازی شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰°C- نگهداری شد.

به عنوان گروه کنترل، ۹۰ نفر از افراد به ظاهر سالم که از نظر سن و جنس با گروه بیماران تقریباً یکسان بودند، انتخاب شدند. این افراد هیچگونه شواهد بالینی و یا سابقه ابتلا به بیماری کبدی نداشتند. همچنین آنزیم‌های کبدی آنها بررسی شد که همگی در محدوده طبیعی قرار داشتند.

از ۲۵۰ میکرولیتر سرم به وسیله پروتئیناز K و سدیم دو سولفات<sup>5</sup>، DNA ویروس استخراج گردید. DNA ویروس به وسیله semi-nested PCR با کمک آنزیم سوپرتک DNA پلی مراز تکثیر شد. پرایمرهای اختصاصی که در این خصوص به کار رفتند عبارتند از:

NG059: 5-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG-3  
شماره دسترسی: AB008394 و موقعیت نوکلئوتید:

۱۹۲۳-۱۹۰۰

NG061: 5-GGC AAC ATG CTG TGG ATA GAC TGG-3  
موقعیت نوکلئوتید: ۱۹۳۸-۱۹۱۵

NG063: 5-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T-3  
موقعیت نوکلئوتید: ۲۱۸۵-۲۱۶۱

راند اول PCR توسط پرایمر فوروارد NG059 و پرایمر ریورس NG063 به ترتیب زیر اجرا شد:

۱۵ دقیقه ۹۵°C به وسیله ۳۵ سیکل، دناتوراسیون ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال ۴۵ ثانیه در ۶۰°C و اکستنسین ۴۵ ثانیه

<sup>3</sup> Antinuclear antibody

<sup>4</sup> Anti-smooth muscle antibody

<sup>5</sup> Sodium dodecyl sulfate

جدول ۱- خصوصیات زمینه ای و یافته های پاراکلینیکی بیماران مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون که از نظر TTV مثبت بودند\*

| ردیف | سن | یافته های بافت شناسی کبد | ANA | ASMA | مارکرهای ویروسی | نمره AIH |
|------|----|--------------------------|-----|------|-----------------|----------|
| ۱    | ۲۱ | سیروز اولیه              | +   | +    | -               | ۱۵       |
| ۲    | ۴۶ | سیروز                    | +   | +    | -               | ۱۵       |
| ۳    | ۵۶ | هیپاتیت مزمن شدید        | -   | +    | -               | ۱۶       |
| ۴    | ۲۸ | هیپاتیت مزمن خفیف        | -   | +    | -               | ۱۸       |
| ۵    | ۲۵ | هیپاتیت مزمن خفیف        | +   | +    | -               | ۱۷       |
| ۶    | ۱۸ | سیروز                    | +   | -    | -               | ۱۵       |
| ۷    | ۵۷ | سیروز                    | +   | +    | -               | ۱۵       |
| ۸    | ۱۶ | هیپاتیت مزمن خفیف        | -   | +    | -               | ۱۴       |
| ۹    | ۴۲ | هیپاتیت مزمن خفیف        | +   | -    | -               | ۱۶       |
| ۱۰   | ۲۱ | هیپاتیت مزمن خفیف        | +   | +    | -               | ۱۵       |

\* بجز بیمار ردیف ۵، در سایر موارد جنسیت بیماران موث بود.

ANA: Antinuclear antibody, ASMA: Anti-smooth muscle antibody, AIH: Autoimmune hepatitis

در مطالعه ما با وجودی که میزان فراوانی TTV در بیماران مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون بالاتر از گروه شاهد بود، ولی ارتباطی بین این ویروس و ابتلا به هیپاتیت اتوایمیون مشاهده نشد. درباره اینکه آیا TTV می تواند عامل شروع کننده هیپاتیت اتوایمیون باشد، مطالعات محدودی وجود دارد. به طوریکه در بررسی مقالات ارتباط این ویروس با بیماری هیپاتیت اتوایمیون تنها در یک مطالعه در ژاپن بررسی شده است (۱۸) که در این مطالعه ۲۰ بیمار ژاپنی مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون و ۵۰ فرد سالم اهداکننده خون از نظر وجود TTV در سرم بررسی و مقایسه شدند که اختلاف معنی داری در دو گروه دیده نشد.

در بعضی مطالعات TTV به عنوان یکی از عوامل دخیل در هیپاتیت های با منشا ناشناخته مطرح شده است (۱۹-۲۱). در ایران تنها یک مطالعه در این زمینه وجود دارد که ۳۷ بیمار تحت درمان با همودیالیز مبتلا به هیپاتیت C را از نظر این ویروس بررسی کردند. در این مطالعه شیوع این ویروس در این بیماران ۱۸٪ بوده و رابطه ای با سطح ALT سرمی یافت نشده است (۲۲).

در مطالعات دیگر، وجود این ویروس در بیماران با هیپاتیت حاد با علت ناشناخته گزارش شده (۲۳) لیکن ارتباطی بین تیترا ویروس و سطح آمینوترانسفرازهای سرمی پیدا نشده است.

در ۷۲°C. در نهایت ۷ دقیقه در ۷۲°C نگهداشته شد. جهت انجام PCR از دستگاه ترموسایکل ایندورف استفاده شد.

راند دوم PCR توسط پرایمر فوروارد NG061 و پرایمر ریورس NG063 مانند راند اول، لیکن با ۲۵ سیکل اجرا شد. محصولات PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل ۱/۵٪ آگارز که به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود، آنالیز شد و تحت نور ماوراء بنفش مشاهده شد.

اطلاعات به دست آمده توسط برنامه SPSS (Version 11) به وسیله آزمونهای آماری کای دو و تست دقیق فیشر آنالیز شدند. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

در کل ۱۸۰ نفر وارد مطالعه شدند که ۹۰ نفر در گروه مورد و ۹۰ نفر در گروه شاهد قرار داشتند. میانگین سنی بیماران مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون  $33/7 \pm 14/5$  بود که ۸۱ از آنها زن بودند. در این گروه TTV در سرم ۱۰ بیمار (۸ زن و ۲ مرد) وجود داشت. میانگین سنی گروه کنترل  $31/1 \pm 5/1$  بود که ۸۱ از آنها نیز زن بودند. در این گروه TTV تنها در سرم ۴ زن یافت شد. از لحاظ سنی و جنسی اختلاف معنی داری بین دو گروه وجود نداشت.

از ۹۰ بیمار مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون، ۱۰ نفر (۱۱٪) از نظر TTV-DNA مثبت بودند و در گروه کنترل ۴ نفر (۴/۴٪) این ویروس را در سرم خود داشته اند. اگر چه میزان فراوانی TTV در گروه بیماران بیشتر از گروه کنترل می باشد، لیکن اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نمی شود (NS).

برخی از خصوصیات زمینه ای و یافته های پاراکلینیکی بیماران هیپاتیت اتوایمیون که از نظر TTV مثبت بودند در جدول شماره ۱ آورده شده است.

## بحث

هیپاتیت اتوایمیون در اثر عملکردهای پیچیده ای بین عوامل شروع کننده، اتوانتی ژنها، عوامل مستعد کننده ژنتیکی و عوامل تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن به وجود می آید (۱۴-۱۷). به نظر می رسد آسیب کبدی ناشی از بعضی از ویروسها و داروها که اپی توپهای مشترک با آنتی ژن های سلول های کبدی دارند منجر به عدم تحمل بدن نسبت به آنتی ژن های خودی شده و باعث واکنش ایمنی بدن بر علیه خود می شوند (۱۰-۱).

<sup>6</sup> Triggering factors

دیگری در ژاپن، فراوانی این ویروس در ۵۰ بیمار مزمن کبدی و ۶۰ اهداکننده خون سالم مقایسه شد و ارتباط معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد (۱۳).

با توجه به نتایج این مطالعه و مجموع مطالعات گذشته، حداقل می توان نتیجه گرفت که TTV در بیماری هپاتیت اتوایمیون نقش عمده ای ندارد. البته بهتر مطالعات با حجم نمونه بالاتر و پیگیری طولانی مدت تر (قبل و بعد از شروع درمان) و در بیماران گوناگون در کشور انجام شود تا بتوان نقش واقعی TTV را در سایر بیماریها نیز بررسی نمود.

بنابراین هنوز مشخص نیست که آنچه در مطالعات اولیه بدست آمده اتفاقی بوده است یا TTV در بعضی از بیماریهای کبدی نقش دارد.

در بیشتر گزارشات موجود ارتباطی بین وجود این ویروس و شواهد هیستولوژیک و بیوشیمیائی ناشی از آسیب کبدی با علت ناشناخته یافت نشده است. برای مثال در مطالعه ای در ایالات متحده آمریکا، ۹۹ اهداکننده خون که سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز آنها بالا بوده است با ۴۶ فرد سالم مقایسه شدند. از نظر وجود و یا عدم وجود این ویروس اختلاف معنی داری بین دو گروه یافت نشد (۱۳). همینطور در مطالعه

## REFERENCES

- Vento S, Garofano T, Di Perri, et al. Identification of hepatitis A virus as a trigger for autoimmune chronic hepatitis type 1 in susceptible individuals. *Lancet* 1991; 337: 1183-7.
- Huppertz HK, Treichel U, Gassel AM, et al. Autoimmune hepatitis following hepatitis A virus infection. *J Hepatology* 1995; 23: 204-8.
- Laskus T, Slusarczyk J. Autoimmune chronic active hepatitis developing after acute type B hepatitis. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1294-7.
- Vento S, Cainelli F, Renzini C, et al. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet* 1997; 350: 1298-9.
- Robertson DAF, Zhang SL, Guy EC, et al. Persistent measles virus genome in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1987; 2: 9-11.
- Seeff LB. Drug-induced chronic liver disease, with emphasis on chronic active hepatitis. *Semin Liver Dis* 1981; 1: 104-15.
- Gough A, Chapman S, Wagstaff K, et al. Minocycline induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome. *BMJ* 1996; 312: 169-72.
- Crosson J, Stillman MT. Minocycline-related lupus erythematosus with associated liver disease. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 867-8.
- Herzog D, Hajoui O, Russo P, et al. Study of immune reactivity of minocycline-induced chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1100-3.
- Elkayam O, Yaron M, Caspi D. Minocycline-induced autoimmune syndromes: An overview. *Semin Arthritis Rheum* 1999; 28: 392-7.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in post-transfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
- Mushahvar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3177-82.
- Bonis PAL. TT Virus. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1828-32.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998; 10: 1-16.
- Czaja AJ, Manns MP, McFarlane IG, et al. Autoimmune hepatitis: the investigational and clinical challenges. *Hepatology* 2000; 31: 1194-200.
- Mackay IR, Weiden S, Hasker J. Autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 124: 767-80.
- Rose NR. Fundamental concepts of autoimmunity and autoimmune disease. In: Krawitt EL, Wiesner RH, Nishioka M, eds. *Autoimmune liver diseases*. 2nd ed. New York: Elsevier Science Publishers. 1998; p: 1-20.

18. Nishiguchi S, Enomoto M, Shiomi S, et al. Virus C and TT virus infections in Japanese patients with autoimmune hepatitis. *J Med Virol* 2002; 66: 258-62.
19. Tatsunori Nakano, Young-Min-Park, Masashi Mizokami, et al. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol* 1999; 30: 389-93.
20. Gad A, Tanaka E, Orii K, et al. Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic liver disease and volunteer blood donors in Egypt. *J Med Virol* 2000; 60: 177-81.
21. Pistello M, Morrica A, Maggi F, et al. TT virus in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol* 2001; 63: 189-95.
22. Daryani NE, Elahian Z, Pezeshki ML, et al. Prevalence of TTV in hepatitis C positive hemodialysis patients and its role in ALT increase. *Journal of Tehran University of Medical Sciences* 2002; 59(6): 78-81.
23. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; 352: 191-95.