

ارتباط ویروسهای DNA دار و لانگرهانس سل هیستوسیتوزیس در کودکان ایرانی

مریم کاظمی اقدم^۱، سید علیرضا ناجی (PhD)^۲، ملیحه خدای (MD, APCP)^{۳*}

۱- مرکز تحقیقات پاتولوژی کودکان، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی تهران
۲- مرکز تحقیقات ویروس شناسی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی تهران
۳- مرکز تحقیقات عفونی کودکان، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی تهران

دریافت: ۹۵/۱۱/۳۰، اصلاح: ۹۶/۳/۹، پذیرش: ۹۶/۳/۳۱

خلاصه

سابقه و هدف: لانگرهانس هیستوسیتوزیس یک بیماری نادر می باشد که بافت های مختلفی را درگیر میکند. از آنجائیکه ویروسها بعنوان عوامل احتمالی ایجاد لانگرهانس سل هیستوسیتوزیس مطرح شده اند. لذا این مطالعه به منظور بررسی ارتباط ویروسهای DNA دار و لانگرهانس سل هیستوسیتوزیس در کودکان ایرانی انجام شد.
مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، بلوک های پارافینی ۴۸ بیمار با تشخیص بالینی و میکروسکوپی لانگرهانس سل هیستوسیتوزیس (LCH)، از نظر وجود DNA ویروس هرپس انسانی ۶- (HHV۶) و ۳۰ بیمار از نظر ویروس های اشدتین بار (EBV)، هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ (HSV۱ و ۲) و سیتومگالوویروس (CMV) بررسی شدند. نمونه های کنترل که از نظر تعداد، سن و نوع بافت مطابقت با نمونه های بیماران داشتند، از بافت هایی که شواهد کلینیکی و میکروسکوپی LCH یا هر تومور بدخیم دیگر در آنها وجود نداشت انتخاب گردیدند. نمونه ها با روشهای Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) برای HHV6 و Qualitative PCR برای CMV و qualitative taq Man Real time PCR (RT-PCR) برای EBV مورد ارزیابی قرار گرفتند.
یافته ها: HHV6 در یک بیمار و ۶ کنترل شناسایی شد. دو بیمار و یک کنترل CMV داشتند. در هیچکدام از بیماران یا شاهد HSV۱ و ۲ شناسایی نشد. EBV در ۱۹ بیمار و ۸ کنترل وجود داشت (p=۰/۰۰۴).

نتیجه گیری: بر اساس مطالعات ما، CMV، HSV۱ و ۲ و HHV6 هیچ نقشی در پاتوژنز LCH نداشته، اما احتمال دخالت EBV در پاتوژنز LCH در ایران وجود دارد.
واژه های کلیدی: ویروس اشدتین بار، سیتومگالوویروس، ویروس هرپس انسانی ۶- ویروس هرپس سیمپلکس، لانگرهانس هیستوسیتوزیس، واکنش زنجیره پلی مراز.

مقدمه

EBV، HHV6 و CMV با LCH توسط برخی محققان گزارش شده و مطرح کننده نقش احتمالی اتیولوژیک و یا شرکت آنها در پاتوفیزیولوژی بیماری می باشد (۹-۱۵). اما عده ای دیگر برعلیه هر گونه ارتباط این بیماری با ویروسهای مختلف در مطالعاتشان دلیل آورده اند (۱۶-۱۸) و بنابراین نقش اتیولوژیک ویروسها در این بیماری به قطعیت نرسیده است. HHV6 در ۴۷٪ بیماران LCH توسط Leahy و همکاران شناسایی شد (۱۳) و Csire و همکاران (۱۱) احتمال شعله ور شدن و یا پیشرفت LCH را با عفونت HHV6 مطرح نمودند. CMV در سلولهای لانگرهانس در ۳۰٪ بیماران Kawakubo و همکاران (۱۴) یافت شده و نقش احتمالی EBV در پاتوفیزیولوژی LCH مطرح گردید (۱۹ و ۲۰). از طرف دیگر، Jeziorski و همکاران (۱۶) و McClain و همکاران (۱۷ و ۱۸) نقشی برای EBV، CMV، و یا HHV6 در پاتوژنز LCH نیافتند و نتیجه مثبتی دال بر وجود HSV در LCH گزارش نشده است (۱۳ و ۱۷ و ۱۸). نظر به اینکه ویروسها احتمالا در ایجاد بدخیمی های متعدد نقش دارند (۲۰-۲۲) و با توجه به این امر که واکنشهای اولیه به همراه درمان عفونتهای ویروسی میتواند نقش پیشگیری کننده داشته باشد، بررسی بیشتر اهمیت دارد. از آنجائیکه تاکنون در ایران وجود ویروس ها در بیماری LCH

لانگرهانس هیستوسیتوزیس (هیستوسیتوزیس X) یک بیماری نادر بوده و یک پرولیفراسیون کلونال هیستوسیتها یا اتیولوژی ناشناخته می باشد. این بیماری میتواند بافتهای مختلفی را درگیر کند و به سه شکل سندرم های بالینی (چند کانونی چند ارگانی یا بیماری Letterer-Swie، چند کانونی تک ارگانی یا بیماری هندشولر کریستین و تک کانونی یا همان اتوزینوفیلیک گرانولوما) اغلب کودکان زیر ۵ سال را درگیر میکند (۱). عوامل پروگنوستیک شامل سن و ارگانهای درگیر می باشند و بیماری در بیشتر موارد بالغین با درگیری ریه، کم کم پسرفت میکند اما در کودکان معمولاً نیاز به درمان دارد (۵-۲). نماهای تشخیصی بافت شناسی آن شامل ساختارهای گرانولومایی با مخلوطی از سلولهای شبیه سلولهای لانگرهانس، اتوزینوفیل، سلولهای ژانت چند هسته ای، ماکروفاژها و لنفوسیتها میباشد (۱ و ۷). سلول لانگرهانس یک سلول تک هسته ای غیرلنفوئیدی بوده و یکی از اعضای خانواده سلولهای دندریتیک است که نقش شروع کننده و شکل دهنده پاسخهای ایمنی را دارد (۸ و ۱۰). سلولهای دندریتیک نارس در لانگرهانس هیستوسیتوزیس از نظر ایمونوهیستوشیمی برای لانگرین (CD207)، آنزیمهای لیزوزومی CD1a و پروتئین S100 مثبت بوده و در میکروسکوپ الکترونی گرانولهای بیربک را نشان میدهند (۷ و ۲).

این مقاله حاصل پایان نامه پریا دهقانیان دستیار فلوشیپ پاتولوژی کودکان و طرحهای تحقیقاتی به شماره های ۹۷۱۰-۸۷-۱۳۹۱، ۹۹۱۶-۸۷-۱۳۹۱، ۱۰۰۶-۸۷-۱۳۹۱ و ۹۵۸۵-۱۱۹-۱۳۹۱ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر ملیحه خدای

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده سلامت کودکان، مرکز تحقیقات عفونی کودکان. تلفن: ۰۲۱-۲۲۲۲۷۰۳۵ E-mail: malihehkhoddami@yahoo.com

استفاده از مجموعه Nested primer تقویت شد. پرایمرها برای nested-PCR شامل موارد زیر بودند:

HHV-1 (outer): 5'-CAATGCTTTTCTAGCCGCTCTTC-3',
HHV-2 (outer): 5'-ACATCTATAATTTTAGACGATCCC-3',
HHV-3 (inner): 5'-TTGTGCGGGTCCGGTTCATCATA-3',
HHV-4 (inner): 5'-TCGGGATAGAAAAACCTAATCCCT-3'

محدودیت شناسایی از ۵۰ کی بی ژنی HHV6 در هر واکنش با استفاده از رقتهای سریال AmpliRun® HHV6-DNA CONTROL (Vircell, S.L. Granada, Spain) تعیین شد.

سیتموگالوویروس: جهت بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده، همچنین مهار تست PCR، بر روی همه اسید نوکلئیک های استخراج شده، beta-globin PCR با استفاده از پرایمر PCO3/PCO4 انجام شد (۲۴). PCR بتاگلوبین در فرمت Syber Green RT-PCR Melting Curve انجام شد. جهت شناسایی RT-PCR CMV با استفاده از مجموعه پرایمر ژنی envelope glycoprotein (CMV-r; 5'-116bp از ژنوم ویروس-5' (CMV-f; 3'-AAGTACCCCTATCGCGTGTG (CMV-3' ATGATGCCCTCRTCCARGTC را با پرابر داخلی (CMV-3' FAM-TGGCCCAGGGTACGGATCTTATTCG-BHQ1-5' (۳) تقویت می کرد (۲۵). تقویت ژنهای gpUL55 CMV، در حجم واکنشی ۲۰ μl تحت شرایط زیر انجام شد: در ابتدا نمونه ها در ۹۴°C بمدت ۱۰ دقیقه دناتوره شدند که با دناتوره شدن در ۹۴°C بمدت ده ثانیه دنبال شد و بعد آن annealing، extension در ۶۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱ دقیقه، ۵۰ سیکل صورت گرفت. در بررسی RT-PCR، سیستم-RT-PCR CFX-96 (BIO-RAD, USA) with HS prime Tag premix Tag Man reagent (GENETOBIO, Korea) به کار رفت. محدودیت شناسایی کی بی ژنی از CMV در هر واکنش با استفاده از رقت های سریال AmpliRun® CYTOMEGALVIRUS DNA CONTROL (Vircell, Spain) تعیین شد.

هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲: بعد از کنترل کیفی DNA استخراج شده برای ژن بتاگلوبین با استفاده از Syber-Green RT-PCR-Melting Curve دو مجموعه از nested PCR برای شناسایی ژنوم های HSV۱ و HSV۲ در نمونه به کار رفت (۲۶). توالی پرایمرها به ترتیب زیر بودند:

HSV1F1ATCRCGGTAGCCCGGCCGTGTGACA;
HSV1R1CATACCGGAAGCCACCACACAA;
HSV2F1TCAGCCCATCCTCCTTCGGCAGTA;
HSV2R1GATCTGGTACTCGAATGTCTCCG;
HSV1F2CATAYCGACCACACCGACGA;
HSV1R2GGTAGTTGGTTCGTCGCGCTGAA;
HSV2F2AGACGTGCGGGTCGTACACG;
HSV2R2CGCGGTCCCAGATCGGCA

با استفاده از مجموعه پرایمر gpD برای HSV۱، ۲، قطعات ۱۴۰، ۱۰۰۰bp به ترتیب برای HSV۱ و HSV۲ مثبت شدند. محدودیت شناسایی

بررسی نگردیده است، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط ویروس های DNA دار مانند CMV، EBV، HHV6 و HSV۱ و ۲ در این بیماری بود که با استفاده از تکنیکهای PCR انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه گذشته نگر بوده و به صورت مورد-شاهدی انجام گردیده است.

بیماران و گروه کنترل: بلوکهای پارافینی ۴۸ بیمار با تشخیص LCH برای ویروس HHV6 و بلوکهای ۳۰ بیمار برای مابقی ویروسها (سال های ۲۰۱۳-۲۰۰۲) از آرشیو دپارتمان پاتولوژی بیمارستان مفید تهران (که یکی از مراکز مهم ارجاع در کشور می باشد) جمع آوری شد. تشخیص LCH توسط پاتولوژیست کودکان با استفاده از معیارهای هیستوپاتولوژیک موجود در کتابهای مرجع پاتولوژی (گرانولوماهایی متشکل از سلولهای لانگرهانس سل با هسته های تیپیک شیاردار و چین خورده مخلوط با ائوزینوفیل و دیگر سلولهای التهابی) داده شده بود (۷و ۶). تشخیص با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی برای CD1a و S100 و CD68 زمانیکه موجود بود قطعی و ثابت شده بود. بعد از بررسی مجدد اسلایدها با میکروسکوپ نوری و تایید تشخیص LCH، بافتهایی که مقدار کافی نمونه داشتند جهت مطالعه انتخاب شدند و مواردی که حجم بافتی بسیار اندک بود از مطالعه خارج شدند.

همه بیماران ایرانی و با محدوده سنی ۲ ماه تا ۱۰ سال بودند. گروه کنترل شامل ۴۸ نمونه بافتی برای ویروس HHV6 و ۳۰ نمونه بافتی برای مابقی ویروسها (CMV، EBV، و HSV۱ و ۲) بود که بدلائل دیگری غیر از بیمای LCH و بیماریهای عفونی تحت جراحی قرار گرفته بودند (نظیر سینوس پیلونیدال، شقاق آنال، اگرما، همانژیوما، هیگرومای کیستیک، آمفیژما، کیستهای بافت نرم، لنف نودهای بزرگ شده، استئوکندرم و ...). این نمونه ها نیز از فایلهای دپارتمان پاتولوژی اطفال بین سالهای ۲۰۰۲ تا ۲۰۱۳ که از نظر سن و محل بافتی با نمونه های LCH مطابقت داشتند، انتخاب شدند. معیار قرار گرفتن بافت در گروه کنترل، عدم وجود شواهد کلینیکی و میکروسکوپی LCH یا هر تومور بدخیم دیگر بود.

آماده کردن بلوک های پارافینی حاوی نمونه های بافتی و استخراج DNA: برشهای بافتی با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم از بلوکهای پارافینی تهیه و در داخل لوله های استریل با در پیچ دار قرار گرفت. محلولهای گزبل و الکل جهت پارافین زدایی و آبرسانی مجدد برشهای بافتی به کار رفت. سپس نمونه های برش خورده توسط بافر لیزکننده بافتی و پروتئیناز K لیز شدند و بافتهای بصورت مایع در آمده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. DNA های بافتی لیز شده مطابق با دستور کمپانی (RTP® DNA/RNA Mini Kit Procedure; Stratec Molecular GmbH, Berlin, Germany) استخراج گردید. DNA استخراج شده و تا زمانیکه بوسیله PCR مورد بررسی قرار گیرند در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

واکنش زنجیره پلی مرز (Polymerase chain reaction):

ویروس هرپس انسانی -۳: بعد از کنترل کیفی DNA استخراج شده با استفاده از Syber-Green RT-PCR-Melting Curve برای ژن بتاگلوبین، nested-PCR جهت شناسایی ژنوم HHV6 در نمونه هایی که قبلاً تعریف شده بود به کار رفت (۲۳). یک ناحیه ژنی ۲۱۴ bp از پروتئین کپسید اصلی ویروس با

یافته‌ها

۳۰ بیمار با تشخیص پاتولوژیک LCH (۱۶ پسر و ۱۴ دختر) و ۳۰ نمونه کنترل که فاقد LCH بودند، بررسی شدند. HHV6-DNA در یک بیمار LCH و ۶ مورد کنترل از ۳۰ مورد شناسایی شدند. تعداد نمونه های LCH و کنترل‌ها در مورد ویروس HHV6 بر اساس توصیه متخصص آمار به ۴۸ مورد (۲۴ پسر و ۲۴ دختر) افزایش پیدا کرد. همه بیماران ایرانی بوده و محدود سنی ۲ ماه تا ۱۰ سال را داشتند. HHV6-DNA در لطف نود یک دختر ۲ ساله با تشخیص LCH (۲/۱٪) از ۴۸ مورد (۲/۱ درصد مثبت و ۹۷/۹ درصد منفی) شناسایی شد (جدول ۱). در گروه کنترل ما HHV6 را در ۶ مورد از ۴۸ مورد (در ۱۲/۵ درصد مثبت و ۸۷/۵ درصد منفی) با ۰/۰۲-۱/۲۹، OR: ۰/۱۵، CI-۹۵٪ LCH؛ $p=0/11$ ؛ شناسایی شد که تفاوت چشمگیری در نتایج شیوع بین بیماران LCH و گروه کنترل نشان نداد. CMV-DNA در یک پسر ۲ ساله با LCH در استخوان فروتال و یک دختر یک ساله با LCH پوست سینه (۲ مورد ۶/۶۶ درصد) از ۳۰ مورد بررسی (۶/۶۶ درصد مثبت و ۹۳/۳۴ درصد منفی) شناسایی شد. در گروه کنترل CMV در یک مورد (۳/۳ درصد) از ۳۰ مورد (۳/۳ درصد مثبت و ۹۶/۷ درصد منفی) با ۰/۱۸-۲۴/۱۵، OR: ۲/۰۷، ۹۵٪ CI of OR: ۰/۱۸-۲۴/۱۵، $p=1$ ؛ شناسایی شد که تفاوت آماری با ارزشی در شیوع CMV بین بیماران LCH و گروه کنترل نشان نداد. HSV-DNA در هیچ یک از ۳۰ بیماران LCH و نیز در هیچکدام از افراد گروه کنترل شناسایی نشد. EBV-DNA در ۱۹ مورد بیمار LCH (۶۳/۳۳ درصد مثبت و ۳۶/۶۷ درصد منفی) شناسایی شد. در گروه کنترل در ۸ مورد از ۳۰ مورد EBV-DNA (۲۶/۷ درصد و ۷۳/۳ درصد منفی) شناسایی گردید با ۱/۵۸-۱۴/۲۵، OR: ۱/۵۸-۱۴/۲۵، CI-۹۵٪ of OR: ۱/۵۸-۱۴/۲۵، $p=0/04$ ، OR: ۴/۷۵، $p=0/04$ ؛ شناسایی شد. EBV برای LCH با نتایج مثبت برای EBV شامل ۱۱ پسر و ۸ دختر بودند (جدول ۱).

۵۰ کپی ژنی از ۱ و ۲ HSV در هر واکنش با استفاده از nested PCR که رفته‌های سریال AmpliRun[®] HSV1, HSV2 DNA CONTROL (Vircell, Spain) استفاده می‌کرد، تعیین شد. ویروس اِشتین بار: بعد از کنترل کیفی DNA استخراج شده با استفاده از Syber-Green RT-PCR-Melting Curve برای ژن بتاگلوبین متد Tag Man برای شناسایی ژنوم EBV بعنوان RT-PCR کیفی بکار رفت. جهت شناسایی EBV، RT-PCR با استفاده از BamH1W EBV sequence primer set که منطقه ژنی ۸۴bp از ژنوم ویروسی (ebv-f; 5'-5'-GCAGCCGCCAGTCTCT-3')، (ebv-r; 5'-5'-ACAGACAGTGCACAGGAGCCT-3) (ebv- داخلی) را با پروب داخلی (ebv-p; 5'-FAM-AAAAGCTGGCGCCCTTGCCTG, BHQ1-3')

شناسایی می‌کرد، استفاده شد (۲۷). تقویت در حجم واکنشی ۲۰ μl تحت شرایط زیر انجام گرفت: در ابتدا نمونه‌ها در ۹۴ °C بمدت ۱۰ دقیقه دناتوره شده و بعد به مدت ۱۰ ثانیه در ۹۴ °C قرار گرفت و سپس مرحله annealing, extension در ۶۰ °C برای یک دقیقه در ۵۰ سیکل انجام گرفت. سیستم RT-PCR، CFX-96 (BIO- RAD, USA) با استفاده از HS Prime Tag premix Tag Man (GENETBIO, Korea) محدودیت شناسایی ۱۵ کپی های ژنوم EBV در هر واکنش با استفاده از رقیق سازی سریال AmpliRun[®] EBV DNA CONTROL (Vircell, S.L. Granada, Spain) تعیین شد. داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمونهای آماری Chi- Square or Fisher's exact test (مقایسه شد و $p < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. سن، جنس، و محل‌های بیوپسی بیماران و نتایج آنها

سن	جنس	کلینیک/محل بیوپسی	HHV6	HSV	CMV	EBV	سن	جنس	کلینیک/محل بیوپسی	HHV6	HSV	CMV	EBV
۲ سال	دختر	گره های لنفاوی	+	-	-	+	۲ سال	دختر	استخوان متاتارس	-	-	-	-
۲ سال	پسر	توده مدیاستن و گردن	-	-	-	+	۱۶ ماه	پسر	پوست	-	-	-	+
۱۰ ماه	پسر	پوست	-	-	-	-	۴ ماه	دختر	پوست	-	-	-	+
۱ سال	پسر	توده پوست سر	-	-	-	+	۱ سال	دختر	پوست (ضایعه متعدد)	-	-	-	+
۲ سال	پسر	استخوان پیشانی	-	-	+	+	۱/۵ سال	پسر	بافت نرم سر	-	-	-	-
۱۱ ماه	پسر	ماستوئید	-	-	-	+	۷ سال	پسر	بافت نرم اطراف مقعد	-	-	-	-
۱ سال	دختر	پوست دیواره قفسه سینه	-	-	+	+	۵ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۳ سال	پسر	استخوان ایلپاک	-	-	-	+	۶ سال	پسر	پوست	-	-	-	-
۶ سال	دختر	قسمت فوقانی استخوان تیپیا	-	-	-	+	۱ سال	دختر	استخوان	-	-	-	-
۱۰ سال	پسر	بافت نرم جمجمه	-	-	-	-	۲ سال	دختر	بافت نرم	-	-	-	-
۲ سال	دختر	استخوان پاریتال	-	-	-	-	۱۷ ماه	پسر	پوست	-	-	-	-
۲ سال	پسر	پوست	-	-	-	+	۴ سال	دختر	گره لنفاوی	-	-	-	-
۸ سال	پسر	بافت نرم سر	-	-	-	+	۱ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۲ سال	دختر	بافت نرم زیر چانه	-	-	-	-	۲ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۲ سال	پسر	استخوان مهره	-	-	-	+	۲۲ ماه	پسر	استخوان	-	-	-	-
۷ سال	پسر	ترقوه و بافت نرم	-	-	-	+	۲ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۱۵ ماه	پسر	توده شکمی	-	-	-	-	۱ سال	پسر	بافت نرم	-	-	-	-
۴ سال	دختر	جمجمه	-	-	-	+	۱۸ ماه	پسر	پوست	-	-	-	-
۲/۵ سال	دختر	لوب راست ریه	-	-	-	+	۲ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۸ سال	دختر	پوست شکم	-	-	-	-	۱ سال	پسر	پوست	-	-	-	-
۲ ماه	دختر	بافت نرم	-	-	-	+	۱ سال	پسر	بافت نرم	-	-	-	-
۲ سال	پسر	بافت نرم سر	-	-	-	+	۲ سال	دختر	پوست	-	-	-	-
۳ سال	دختر	استخوان پیشانی و بافت نرم	-	-	-	-	۵ سال	پسر	پوست	-	-	-	-
۳ سال	دختر	بافت نرم سر	-	-	-	-	۳ سال	دختر	پوست	-	-	-	-

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه در ۱۹ مورد از ۳۰ مورد بیمار LCH (۶۳/۳۳٪) DNA-EBV یافت شد، که احتمال دخالت ایتولوژیک آن را در این بیماری مطرح می-سازد. HSV1 و HSV2، CMV و HHV6 ارتباط معنی داری با LCH نشان ندادند. گزارشی از ارتباط ویروس ها در کودکان ایرانی مبتلا به LCH موجود نیست. CMV می تواند سلولهای دندریتیک (DC) و سلولهای لانگرهانس (LC) را آلوده کند (۲۸-۳۰)، EBV مونوسیت ها و LC را در طی دوره عفونی درگیر می کند (۳۱ و ۳۲).

بعلاوه در سندرمهای هموفագوسیتیک در بیماران با نقص ایمنی های مادرزادی متعدد بنظر میرسد EBV و CMV نقش داشته باشد (۲۸-۳۰). یافته های Jeziorski و همکاران (۱۶) بر علیه فرضیه نقش EBV، CMV، و HHV6 در پاتوژنز LCH بوده است. McClain و همکاران (۱۷ و ۱۸) نتوانستند ژنوم آدنوویروس، CMV، EBV، HSV، HHV6، HIV (Human Immune Deficiency Virus)، و ویروس انسانی T سلو کمی تیپ I و II (HTLV I,II) و پاروویروس را در ۵۶ مورد LCH با استفاده از تکنیک های In Situ Hybridization (ISH) و PCR شناسایی کنند. در مورد نقش ایتولوژیک HHV6 در LCH نظرات متفاوتی وجود دارد (۱۳-۱۸ و ۱۶). HHV6 در ۴۷٪ بیماران LCH با استفاده از تکنیک PCR توسط Leahy و همکاران شناسایی شد (۱۳). Glotzbecker و همکاران (۱۲) ۷۱٪ نتیجه مثبت برای HHV6 را با متدهای IHC و ISH گزارش کردند اما با استفاده از RT-PCR کمی و کیفی تفاوت قابل توجهی بین ۱۳ بیمار LCH در مقایسه با گروه کنترل وجود نداشت. Csire و همکاران (۱۱) بیماری را LCH را معرفی نمودند که در وی HHV6 بصورت مداوم در طی ۱۷ سال پیگیری مثبت بود و وجود ارتباط احتمالی عفونت HHV6 با شعله ور شدن و یا پیشرفت LCH را مطرح کردند. شناسایی CMV در LCs در ۳۰٪ از ۲۹ بیمار توسط Kawakubo و همکاران (۱۴) با استفاده از IHC، ISH و PCR ممکن است دلیل بر این امر باشد که آزاد شدن سیتوکائینها میتواند پرولیفراسیون LCs را تحریک نموده و LCH را ایجاد کند. هیچ نتیجه مثبتی در مقالات مبنی بر وجود ارتباط HSV با LCH گزارش نشده است (۱۳ و ۱۷ و ۱۸). EBV در بدخیمی های متعددی تاثیرگذار شناخته شده و مشخص شده هریس ویروسها در عفونتهای مداوم نقش دارند (۲۲-۲۰) و نقش

ایتولوژیک احتمالی یا مشارکت EBV در پاتوفیزیولوژی LCH مطرح شده است (۱۹ و ۱۵ و ۱۰ و ۹). این نتایج متناقض در مطالعات میتواند بعلت حساسیت متفاوت تکنیکها و یا تفاوت های منطقه ای باشد. در مطالعات قبلی با استفاده از سرولوژی، IHC، ISH، PCR، هیچ محدودیتی اعلام نگردید (۱۳-۱۸ و ۱۵). تکنیکهای IHC، ISH در دسترس ما نبودند و بررسی سرولوژیک از نظر این عفونتها برای بیماران انجام نشده است.

در همراهی با مطالعات انجام شده دیگر محققان که به نتایج مثبتی دست یافتند (۱۵ و ۱۰ و ۹) ما نیز EBV-DNA را در ۱۹ مورد از ۳۰ مورد بیمار LCH (۶۳/۳۳٪) با $p=0.004$ ، $OR: 1/58-14/25$ ، $95\% CI$ of Odds $4/75$ ؛ Ratio شناسایی کردیم. نتایج مثبت در ۸ مورد کنترل (۲۶/۷٪) میتواند تصادفی باشد. در مطالعه اخیر، مانند دیگر گزارشات منفی (۱۶-۱۸) تفاوت معنی داری در شناسایی HHV6 و بیماران LCH و گروه کنترل مشاهده نشد. CMV-DNA در دو بیمار LCH (۶۶/۶٪) وجود داشت و P value: 1 در حمایت از نتایج منفی مطالعات دیگر میباشد (۱۶-۱۸). همچنین مطالعات قبل (۱۳ و ۱۷ و ۱۸) ما نیز توانستیم DNA های HSV1 و HSV2 را در هیچیک از بیماران LCH شناسایی کنیم. تکنیک های دیگری جهت تایید حضور EBV در سلولهای لانگرهانس در مطالعه ما وجود نداشت و نقش ایتولوژیک EBV بصورت قطعی قابل اثبات نمیشد، اما نتایج مثبت گزارش شده در مطالعات دیگر (۱۵ و ۱۰ و ۹) علاوه بر ۶۳/۳۳٪ مثبت شدن مطالعه ما، قویاً احتمال نقش موثر EBV در القا LCH را مطرح میکند. این نتایج بدلیل اینکه واکسیناسیون یا تشخیص اولیه و درمان عفونت EBV احتمالا میتواند از ظهور LCH در آینده پیشگیری کند حائز اهمیت است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران جهت حمایت مالی از این تحقیق و از آقای دکتر احمدرضا شمشیری بابت آنالیز آمار، خانم دکتر پریا دهقانپیان و مهسا وحدتی نیا جهت جمع آوری اطلاعات، خانمها لیلا پوس اشکان و پونه توکلی جهت انجام PCR و همچنین مژگان شهدایی بابت همکاری در کار تکنیکی، تشکر و قدردانی می گردد.

DNA Viruses and Langerhans Cell Histiocytosis in Iranian Children

M. Kazemi Aghdam (MD, APCP)¹, S.A. Naji (PhD)², M. Khoddami (MD, APCP)^{*3}

1. Pediatrics Pathology Research Center, Pediatrics Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

2. Virology Research Center, Institute of Tuberculosis and Pulmonary Diseases Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

3. Infectious Disease Research Center, Pediatrics Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 19(10); Oct 2017; PP: 14-20

Received: Feb 18th 2017, Revised: May 30th 2017, Accepted: Jun 21th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Viruses are suggested as possible etiologic factor of Langerhans cell histiocytosis (LCH) by some investigators. Nonetheless, no report was found on this subject in Iranian children. We looked for the presence of Epstein-Barr virus (EBV), human herpesvirus-6 (HHV-6), herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2, and Cytomegalovirus (CMV) in children with LCH.

METHODS: The investigation in this retrospective study, was for the presence of HHV-6 DNA in 48 patients and CMV, HSV types 1 and 2 and EBV DNA in 30 patients with LCH, using paraffin-embedded tissue samples and 48 and 30 (respectively) age and tissue-matched controls from the department of pediatric pathology, using nested polymerase chain reaction (nested-PCR for HHV-6 and HSV types 1 and 2), qualitative PCR method (for CMV) and qualitative TaqMan Real-time PCR (for EBV).

FINDINGS: HHV-6 was found in one (2.1%) patient and six (12.5%) control specimen ($P=0.11$, OR: 0.15; 95%CI: 0.02-1.29). Two (6.66%) patients and one (3.3%) control sample had CMV, with a P value of 1.0, and OR: 2.07; 95% CI of OR: 0.18-24.15. We did not find HSV types 1 and 2 DNA in any of the patients or controls. EBV was detected in 19 (63.33%) patients and 8 (26.7%) control group. P value was 0.004 with Odds Ratio: 4.75; 95% CI of OR: 1.58-14.25.

CONCLUSION: CMV, HSV types 1 and 2, and HHV6 do not appear to have any role in the pathogenesis of LCH. However, considering the statistically significant $p=0.004$, our findings suggest a possible position for EBV in the pathogenesis of LCH in Iran.

KEY WORDS: Cytomegalovirus; Epstein-Barr virus; Histiocytosis; Langerhans-Cell; Herpes Simplex Virus; Human Herpes Virus-6; Polymerase Chain reaction.

Please cite this article as follows:

Kazemi Aghdam M, Naji SA, Khoddami M. DNA Viruses and Langerhans Cell Histiocytosis in Iranian Children. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(10):14-20.

* Corresponding author: M. Khoddami (MD, APCP)

Address: Pediatric Infectious Diseases Research Center, Pediatrics Health Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 22227035

E. mail: malihehkhoddami@yahoo.com

References

1. Weiss LM, Histiocytic and dendritic cell proliferations. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Knowles DM. P. 1815-1845.
2. Ladisch S. Langerhans cell histiocytosis. *Curr Opin Hematol*. 1998;5(6):347-58.
3. Laman JD, Leenen PJ, Annels NE, Hogendoorn PC, Egeler RM. Langerhans-cell histiocytosis 'insight into DC biology'. *Trends Immunol*. 2003;24(4):190-6.
4. Berber I, Erkurt MA, Kuku I, Koroglu M, Kaya E, Unlu S. A rare disease in adult: Langerhans cell histiocytosis. *World J Oncol*. 2013;4(3):165-8.
5. Ninaber M, Dik H, Peters E. Complete pathological resolution of pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Resp case reports*. 2014;2(2):76-8.
6. Lichtenstein L. Histiocytosis X; integration of eosinophilic granuloma of bone, Letterer-Siwe disease, and Schuller-Christian disease as related manifestations of a single nosologic entity. *AMA Arch Pathol*. 1953;56(1):84-102.
7. French Histiocytosis study group. A multicentre retrospective survey of Langerhans' cell histiocytosis: 348 cases observed between 1983 and 1993. *Arch Dis Child*. 1996;75(1):17-24.
8. Willman CL, Busque L, Griffith B, Favara BE, McClain KL, Duncan MH. Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)-a clonal proliferative disease. *N Engl J Med*. 1994;331(3):154-60.
9. Chen CJ, Ho TY, Lu JJ, Sheu LF, Lee SY, Tien CH, Cheng SN. Identical twin brothers concordant for Langerhans' cell histiocytosis and discordant for Epstein-Barr virus-associated haemophagocytic syndrome. *Eur J Pediatr*. 2004;163(9):536-9.
10. Sakata N, Toguchi N, Kimura M, Nakayama M, Kawa K, Takemura T. Development of langerhans cell histiocytosis associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediat Blood Cancer*. 2008;50(4):924-7.
11. Csire M, Mikala G, Jákó J, Masszi T, Jánosi J, Dolgos J, et al. Persistent long-term human herpes virus 6 (HHV-6) infection in a patient with langerhans cell histiocytosis. *Pathol Oncol Res*. 2007;163(9):157-60.
12. Glotzbecker MP, Carpentieri DF, Dormans JP. Langerhans cell histiocytosis: a primary viral infection of bone? Human herpes virus 6 latent protein detected in lymphocytes from tissue of children. *J Pediatr Orthop*. 2004;24(1):123-9.
13. Leahy MA, Krejci SM, Friednash M, Stockert SS, Wilson H, Huff JC, Weston WL, Brice SL. Human herpes virus 6 is present in lesions of Langerhans cell histiocytosis. *J Invest Dermatol*. 1993;101(5):642-5.
14. Kawakubo Y, Kishimoto H, Sato Y, Yanagimoto K, Tsuruta T, Yashihiro O, Kameya T. Human cytomegalovirus infection in foci of Langerhans cell histiocytosis. *Virchows Arch*. 1999;434(2):109-15.
15. Shimakage M, Sasagawa T, Kimura M, Shimakage T, Seto S, Kodama K, Sakamoto H. Expression of Epstein-Barr virus in Langerhans' cell histiocytosis. *Human pathol*. 2004;35(12):862-368.
16. Jeziorski E, Senechal B, Molina TJ, Devez F, Leruez-Ville M, Morand P, et al. Herpes-virus infection in patients with langerhans cell histiocytosis: a case-controlled sero-epidemiological study, and in situ analysis. *PLoS One*. 2008;3.
17. McClain K, Jin H, Gresik V, Favara B. Langerhans cell histiocytosis: lack of a viral etiology. *Am J Hematol*. 1994;47(1):16-20.
18. McClain K, Weiss RA. Viruses and langerhans cell histiocytosis: is there a link?. *Br J Cancer Suppl*. 1994;70(23):34-6.
19. Murakami I, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Nagata K, et al. Interleukin-1 loop model for pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *Cell Communication and Signaling*. 2015;13(13).

- 20.Ashraf MJ, Makarempour A, Monabati A, Azarpira N, Khademi B, Hakimzadeh A, Abedi E, Valibeigi B. Comparison between presence of epstein barr virus in nodal and extra nodal diffuse large b cell lymphoma of head and neck, an iranian experience. *Iran Red Crescent Med J*. 2012;14(12):764-70.
- 21.Purtilo D. Epstein-Barr-virus-induced oncogenesis in immune-deficient individuals. *The Lancet*. 1980;315:300-3.
- 22.Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Rev Cancer*. 2004;4(10):757-68.
- 23.Luiz CR, Machado CM, Canto CL, Christ SC, Pestana JO, Kotton CN, Camargo LF. Monitoring for HHV-6 infection after renal transplantation: evaluation of risk factors for sustained viral replication. *Transplant*. 2013;95(6):842-6.
- 24.Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986;324(6093):163-6.
- 25.Hernandez AK, Emmons J, Wimmer DB, Payne DA. Cytomegalovirus-Antigenemia-Positive and Polymerase-Chain-Reaction-Negative Transplant Patient. *Lab Med*. 2008;39(6):341-2.
- 26.Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Forsgren M. Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *J Med Virol*. 1993;39(3):179-86.
- 27.Fan H, Kim SC, Chima CO, Israel BF, Lawless KM, Eagan PA, Elmore S, Moore DT, Schichman SA, Swinnen LJ, Gulley ML. Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med virol*. 2005;75(1):59-69.
- 28.Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES. Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J Virol*. 2003;77(13):7563-74.
- 29.Lee AW, Hertel L, Louie RK, Burster T, Lacaille V, Pashine A, Abate DA, Mocarski ES, Mellins ED. Human cytomegalovirus alters localization of MHC class II and dendrite morphology in mature Langerhans cells. *J Immunol*. 2006;177(6):3960-71.
- 30.Senechal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood*. 2004;103(11):4207-15.
- 31.Tugizov S, Herrera R, Velupillai P, Greenspan J, Greenspan D, Palefsky JM. Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol*. 2007;81(11):5484-96.
- 32.Walling DM, Ray AJ, Nichols JE, Flaitz CM, Nichols CM. Epstein-Barr virus infection of Langerhans cell precursors as a mechanism of oral epithelial entry, persistence, and reactivation. *J Virol*. 2007;81(13):7249-68.