بررسی ایمنی هومورال نسبت به بورلیا در سرم و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به اسکلروز مولتیپل

آرزو راستی M.Sc.[☆]، سید محمد مؤذنی Ph.D.[☆♦]، محمد حسین صنعتی Ph.D.[★]

☆ دانشگاه تربیت مدرس، گروه ایمونولوژی

★ مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی

چکیده

* **هدف:** به منظور ارزیابی نقش عفونت بورلیائی در بروز بیماری اسکلروز مولتیپل (MS) وجود آنتی بادی بر علیه بورلیا پرسیکا (شایعترین گونه بورلیا در ایران) در سرم و مایع مغزی نخاعی افراد مبتلا مورد مطالعه قرار گرفت.

* **مواد و روشها:** وجود آنتی بادی بر علیه آنتی ژنهای بورلیا پرسیکا در سرم و مایع مغزی نخاعی ۵۰ بیمار مبتلا به MS و ۳۰ نفر کنترل طبیعی که از نظر سن و جنس با گروه آزمایش همخوانی داشتند با استفاده از تکنیک ایمونوبلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. دو نمونه از مهمترین آنتی ژنهای سطحی بورلیا برگدورفری (OspA و OspD) که با استفاده از تکنولوژی نوترکیب تهیه شده بودند نیز در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** نتایج به دست آمده نشان داد که ۳۲ نفر از ۵۰ بیمار مبتلا به MS و تعدادی از افراد کنترل مورد آزمایش، در سرم خود حاوی آنتی بادی علیه بعضی از باندهای پروتئینی بورلیا هستند. آزمون صحت فیشر نشان دهنده وجود اختلاف معنی داری بین بیماران MS و نمونه‌های کنترل در مورد باند ۴۳ کیلودالتونی بود که در بیماران MS مثبت و در تمامی افراد کنترل منفی گردید. واکنش مثبت در مورد لیپو پروتئینهای سطحی بورلیا (OspA و OspD)، در سرم و مایع مغزی نخاعی هیچ یک از بیماران و افراد کنترل مشاهده نشد.

* **نتیجه‌گیری:** با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده و تشابهات زیادی که بین بیماریزایی و علایم بالینی MS و بیماری اسپیروکتی لایم مشاهده می‌شود، می‌توان گفت که شواهدی در مورد منشاء اسپیروکتی بیماری MS وجود دارد، اما اثبات آن تحقیقات بیشتری را می‌طلبد.

گل واژگان: اسکلروز مولتیپل، بورلیا، پاسخ ایمنی هومورال

مقدمه

MS[1] یک بیماری التهابی و مزمن سیستم اعصاب مرکزی (CNS)[2] و جزء ناهنجاریهای عصبی است که در مراحل اولیه ماده سفید CNS را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱). این بیماری با انفیلتراسیون سلولهای ایمنی به CNS، تخریب میلین و فقدان اولیگودندروسیتها که در ساخت میلین نقش دارند مشخص شده (۲) و بیشتر در سنین ۴۰-۲۰ سالگی بروز می‌کند (۱).

علت این بیماری تاکنون شناخته نشده است (۳) اما عوامل متعددی را در ایجاد آن دخیل می‌دانند (۴). به طور کلی مطالعات اپیدمیولوژیک دخالت دو دسته از عوامل را در ایجاد MS مطرح می‌کنند که شامل عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی می‌باشد (۵). مشاهدات زیادی فرضیه دخالت عوامل محیطی را تاکید می‌کند که عبارتند از:

۱. شیوع MS با افزایش فاصله از خط استوا و زیاد شدن عرض جغرافیائی زیاد می‌شود.

۲. مهاجرت در میزان ابتلا به MS نقش دارد.

۳. در دوقلوهای یکسان بروز بیماری در هر دو نفر نادر است که اگر MS منحصراً علت ژنتیکی داشت این مسئله صادق نبود.

۴. اپیدمیهایی مشابه آنچه که در بیماریهای عفونی مشاهده می‌شود در مورد MS گزارش شده است.

۵. در برخی نواحی تغییرات در میزان شیوع MS سریعتر از آن است که بتواند به تنهایی تحت تاثیر عوامل ژنتیکی باشد (۵).

از طرفی تشابهات پاتولوژیک MS با مدل حیوانی القاء شده بیماری (EAE)[3] به منشاء خود ایمن MS اشاره دارد. در گونه‌های حیوانی مختلف می‌توان با تزریق پروتئین اصلی میلین (MBP)[4] و پروتئین پروتئولیپید (PLP)[5] و یا انتقال پاسیو سلولهای $CD4^+T$ اختصاصی MBP یا PLP، بیماری EAE را ایجاد نمود (۲).

لنفوسیتهای T خود واکنشگر توسط سوپر آنتی ژنها، تقلید مولکولی یا مکانیسمهای ناشناخته دیگر تحریک شده و وارد CNS می‌شوند، متعاقب ترشح سیتوکینهای پیش التهابی توسط لنفوسیتهای T فعال شده سایر سلولهای التهابی مانند ماکروفاژها نیز فعال شده و به درون CNS راه پیدا می‌نمایند. نهایتاً ماکروفاژها و میکروگلیهای فعال شده سبب آسیب رساندن و تخریب میلین می‌گردند (۲).

عوامل عفونی از جمله فاکتورهای محیطی هستند که اولین بار توسط پیرماریه (۱۸۸۴) دخالت آنها در ایجاد بیماری MS مطرح شد (۶). این عوامل عبارتند از: ویروسها، انگلها و باکتریها. اما تاکنون علیرغم تحقیقات متعدد ویروس خاصی از بیماران MS جدا نشده است (۱) و شواهد کافی نیز در این خصوص ارائه نگردیده است (۷). مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که پارازیتها از جمله توکسوکارا و توکسوپلاسما نیز در ایجاد MS نقش ندارند (۱).

از طرفی مشاهده شده است که بعضی باکتریها از جمله بورلیا در میلین زدائی اعصاب نقش دارند (۱) و پپتیدهای میکروبی سبب شروع پاسخ خودایمن توسط سلولهای T و تولید آنتی بادیهای ضد میلین می‌شوند و نیز مشاهده شده که افزایش تماس با میکروبها در میزان ایجاد EAE نقش دارد (۸).

مکانیسمهایی که در ارتباط بین پپتیدهای میکروبی و خود ایمنی مطرح شده‌اند عبارتند از: ۱ـ تقلید مولکولی (۹)، ۲ـ فعال شدن غیر اختصاصی سلولهای T موجود در موضع عفونت ناشی از گسترش اپی‌توپ (۹)، ۳ـ دخالت سوپر آنتی ژنها (۹).

از بین عفونتهای باکتریائی که احتمالاً در ایجاد MS دخالت دارند مطرح‌ترین آنها عفونتهای اسپیروکتی می‌باشد که طرح آن دارای سابقه طولانی است. از سال ۱۹۰۹ تا اواسط دهه ۱۹۵۰ جامعه پزشکی MS را یک بیماری اسپیروکتی می‌دانست چرا که با تلقیح مایع مغزی نخاعی (CSF)[6] بیماران MS به حیوانات آزمایشگاهی اسپیروکتها رشد می‌کردند. وجود اسپیروکتها در بافت CNS قربانیان MS با رنگ‌آمیزی نقره نیز ثابت شد. اما در سال ۱۹۵۰ یک محقق آمریکائی توضیح داد که آلودگی آب مقطر با اسپیروکتها منجر به کشتهای مثبت کاذب شده است. اگر چه بعدها خود او این مسأله را تکذیب نمود اما انتشار این خبر منجر به بی‌اعتباری تحقیقات ۵۰ ساله و غیرقابل اعتماد گردیدن فرضیه اسپیروکتی MS گردید (۶).

در سال ۱۹۸۶ فرضیه ارتباط سینوزیت مزمن اسپیروکتی و MS مطرح شد. به این شکل که اسپیروکتهای مستقر در اوروفارنکس تمایل به هجوم به بافت موکوسی و ایجاد عفونتهای عود کننده مزمن و انفیلتراسیون سلولی دارند. لذا می‌توان آنها را عامل MS قلمداد نمود (۱۰). از طرفی با توجه به شباهت بسیار زیادی که بین گسترش جغرافیائی، علائم کلینیکی و بیماریزائی بیماری اسپیروکتی لایم و MS پیدا شده (۱۱) و به نتیجه نرسیدن تحقیقات متعددی که در ارتباط با نقش ویروسها در بیماری MS انجام گرفته است، امروزه پس از سالها فرضیه ارتباط MS و اسپیروکتها مجدداً احیاء شده است.

بیماریزائی بورلیا برگدورفری، عامل بیماری لایم، عمدتاً به لحاظ پروتئینهای سطحی خارجی (Osps) این میکروارگانیسم است که دارای انواع مختلف و از A تا F شناسایی شده‌اند (۱۲). این پروتئینها از نظر وزن مولکولی و خاصیت ایمنی‌زائی با همدیگر تفاوت دارند (۱۳).

با توجه به نقش احتمالی بورلیا در بیماری MS در این تحقیق به بررسی پاسخ ایمنی هومورال مبتلایان به MS در برابر آنتی‌ژنهای بورلیا پرداخته شده است و بدین منظور آنتی ژنهای شایعترین گونه بورلیا در ایران یعنی بورلیا پرسیکا مورد استفاده قرار گرفت. البته دو نمونه از مهمترین آنتی‌ژنهای سطحی بورلیا برگدورفری (OspA و OspD) که با استفاده از تکنولوژی نوترکیب تهیه شده بودند نیز در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روشها

* جمع آوری سرم و مایع مغزی نخاعی

۵۰ نمونه سرم و ۱۵ نمونه CSF بیماران MS از بخشهای

1. Multiple Sclerosis
2. Central Nervous System
3. Experimental Allergic Encephalomyelitis
4. Myelin Basic Protein
5. Proteolipid Protein
6. Cerebrospinal Fluid

نورولوژی بیمارستانهای امام‌خمینی و شریعتی تهران جمع آوری شد (نمونه‌های CSF از همان بیمارانی بود که نمونه سرم در اختیار تحقیق قرار داده بودند). به علاوه ۳۰ نمونه سرم به عنوان کنترل منفی از افراد طبیعی و ۳ نمونه کنترل منفی CSF از بیماران مبتلا به Pseudotumor cerebrii که علیرغم طبیعی بودن ترکیبات مایع مغزی نخاعی به منظور کاهش فشار مایع مغزی نخاعی، CSF می‌دهند، جمع آوری شد.

اطلاعات مربوط به بیماران نیز در فرم پرسشنامه تهیه شده در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ثبت گردید. ابتلاء به بیماری MS بر اساس معیارهای بررسی تاریخچه بیماران و مطابقت علائم کلینیکی بیماران (اختلالات اعصاب حسی و حرکتی) با بیماری MS، اثبات وجود ضایعات ویژه بیماری به نام پلاک در مغز و نخاع بیماران، افزایش سلولهای تک هسته‌ای و حضور باندهای اولیگوکلونال در CSF بیماران و تشخیص پزشک متخصص، تائید می‌شد.

* تهیه آنتی ژن

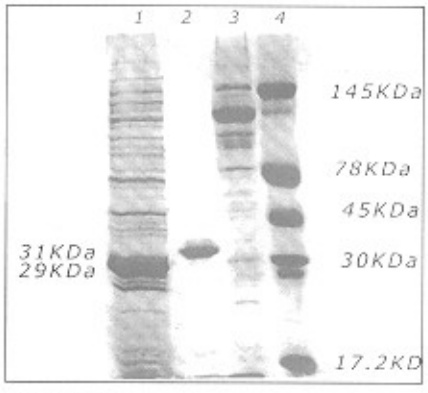
پروتئین OspA بورلیا برگدورفری از کمپانی Smith Kline & Beecham به صورت اهدائی تهیه و پروتئین OspD به صورت نوترکیب در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه و تلخیص شد.

برای تولید پروتئین تام[1] بورلیا پرسیکا عامل شایع بورلیوزیس در ایران، این باکتری به خوکچه هندی طحال برداری شده تزریق و پس از اینکه در خون حیوان به حد کافی تکثیر گردید از خوکچه هندی خونگیری و طی مراحلی اسپیروکتها از خون محیطی خوکچه جداسازی شد. سپس با بافر فسفات سالین (PBS) مخلوط و با استفاده از سونیکاتور دیواره سلولی باکتریها در هم شکست. سوسپانسیون نهائی حاوی ۴/۹mg/ml پروتئین بود. غلظت پروتئین در نمونه‌ها با روش لوری تعیین گردید.

* آزمایش ایمونوبلاتینگ

پروتئینهای مذکور با استفاده از تکنیک SDS-PAGE و با استفاده از درصدهای متفاوت ژل پلی آکریل آمید الکتروفوز شدند و مشخص شد که در ژل ۱۱/۵درصد پلی آکریل آمید تفکیک پروتئینها به خوبی صورت می‌گیرد. سپس میزان اپتیمم پروتئینهای OspA و OspD و توتال پروتئین بورلیا پرسیکا به ازاء هر چاهک به ترتیب ۷، ۱۰ و ۱۲/۵ میکرولیتر به دست آمد که پروتئینهای مورد مطالعه با مقادیر مذکور در ژل ۱۱/۵درصد پلی اکریل آمید و در حضور SDS الکتروفوز شدند (شکل ۱).

سپس باندهای پروتئینی با استفاده از تکنیک وسترن بلات به روش نیمه خشک، به غشاء نیتروسلولز ۰/۴۵ میکرونی انتقال یافتند. پس از آن غشاهای نیتروسلولزی حاوی هر یک از پروتئینها به صورت نوارهای باریک بریده شد و هر نوار با رقت ۱/۵۰ سرم و CSF بیماران و افراد کنترل نرمال، به عنوان آنتی بادی اولیه مجاور گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در حرارت اتاق، نوارهای خارج شده از سرم و CSF بیماران و افراد کنترل، شسته شده و با رقت ۱/۱۰۰۰ آنتی بادی ثانویه (آنتی هیومن کنژوگه با HRP) (کمپانی DAKO)، مجاور گردید و پس از انکوباسیون مجدد و شستشو، سوبسترای ۴ کلرونفتول (سیگما) اضافه و پس از ظاهر شدن باندهای پروتئینی به رنگ بنفش واکنش متوقف شد. لازم به ذکر است که رقت مناسب سرم و CSF بیماران و آنتی بادی ثانویه از طریق آزمایشات تیتراسیون به دست آمد.



شکل ۱: ژل رنگ‌آمیزی شده توسط کوماسی بلو، پس از پایان SDS-PAGE
OspD در باکتری ترانسفرم شده، با وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون (1) OspA، ۳۱ کیلو دالتون (2) پروتئین تام بورلیا پرسیکا (3) مارکر پروتئینی استاندارد (4)

* تهیه نمونه کنترل مثبت

لازم به ذکر است که در کنار آزمون مربوط به بیماران از نمونه کنترل مثبت سرم خرگوش استفاده شد که برای تهیه این نمونه سرم، پروتئین بورلیا پرسیکا به میزان ۱۵۰ میکرولیتر با غلظت ۳/۵mg/ml با استفاده از ادجوانت کامل و ناقص فروند در سه نوبت به صورت زیر جلدی در دو طرف گردن خرگوش تزریق گردید و در پایان روز سی و یکم که تیتر آنتی بادی در خرگوش به حداکثر رسیده بود خونگیری و جداسازی سرم از خون خرگوش انجام شد و به عنوان کنترل مثبت در کنار نمونه بیماران، غشاء حاوی پروتئینهای بورلیا پرسیکا در رقت ۱/۵۰ سرم خرگوش قرار گرفت و از کنژوگه HRP-Goat anti Rabbit (بیوژن) با رقت ۱/۲۰۰۰ به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد.

یافته‌ها

۳۲ نفر از بیماران که به صورت در دسترس انتخاب شده بودند مؤنث و ۱۸ نفر مذکر بودند که نشان دهنده بروز بیشتر بیماری در خانمها نسبت به آقایان است. ۱۹ نفر از گروه شاهد مونث و ۱۱ نفر مذکر بودند که با آنالیز آماری Chi square اختلاف معنی داری بین جنس بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد (P= 0/1060).

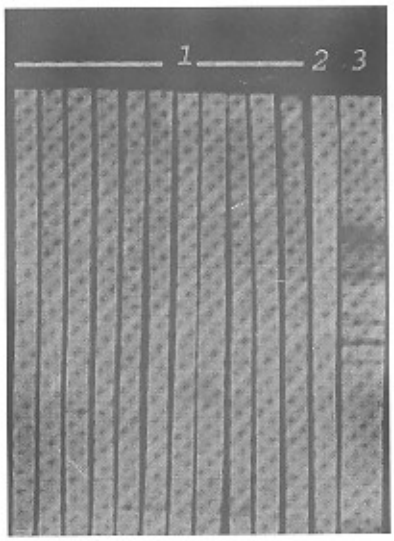
در بیماران تحت مطالعه بیشترین فراوانی مربوط به گروه سنی ۳۰-۲۱ ساله بود و سن شروع بیماری نیز در اکثر بیماران در همین محدوده بود. سن گروه شاهد از ۱۹ تا ۶۶ سال و بیماران از ۱۶ تا ۷۲ سال بود که آزمون T test (P= 0.305) اختلاف معنی داری بین سن

1. Total Protein

دو گروه بیمار و شاهد نشان نداد.

از نظر علائم بالینی اکثریت بیماران هنگام شروع بیماری و در زمان نمونه‌گیری، از ضایعات نخاعی رنج می‌بردند و سیر بیماری در آنان عودکننده و بهبود یابنده بود، در هیچ یک از بیماران تاریخچه مثبت فامیلی بیماری MS، سابقه لایم و گزش کنه وجود نداشت و تعداد کمی از بیماران دارای سابقه مهاجرت، مسافرت به خارج کشور و سینوزیت بودند.

انجام آزمایش وسترن بلات با استفاده از توتال پروتئین بورلیا پرسیکا بر روی نمونه‌های سرم گروه بیمار و شاهد نشان داد که ۳۳ نفر از بیماران و تعدادی از افراد شاهد دارای Ab علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا هستند (شکل ۲).



شکل ۲: آزمایش وسترن بلات سرم بیماران با استفاده از توتال پروتئین بورلیا پرسیکا
۱- نوارهای نیتروسلولز مجاور شده با سرم بیماران به عنوان آنتی بادی اولیه
۲- نوار نیتروسلولز بدون آنتی بادی اولیه (کنترل منفی)
۳- نوار نیتروسلولز مجاور شده با سرم خرگوش حاوی آنتی بادی بر علیه بورلیا پرسیکا (کنترل مثبت)

همچنین در ۶ نمونهٔ از CSF بیماران، وجود Ab علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا مشخص گردید. به منظور محاسبهٔ وزن مولکولی باندهای پروتئینی که علیه آنها Ab وجود داشت، ابتدا منحنی کالیبراسیون بر حسب حرکت نسبی (RF) باندها و لگاریتم وزن مولکولی پروتئینهای استاندارد بر روی کاغذ نیمه لگاریتمی رسم گردید و سپس با استفاده از RF کلیه باندهای پروتئینی رؤیت شده، وزن مولکولی باندهای پروتیئن محاسبه گردید.

در سرم بیماران Ab علیه باندهای پروتئین از ۲۳ تا ۲۵۱ کیلودالتون مشاهده شد که تعدادی از این باندها در افراد شاهد نیز وجود داشت. فراوانی وجود آنتی بادی علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکای سرم گروه بیمار و شاهد در جدول ۱ خلاصه شده است.

در نهایت مشخص شد که Ab علیه باندهای پروتئین ۱۲۵ و ۴۳ کیلودالتونی فقط در سرم بیماران به ترتیب با فراوانی ۵ و ۷ وجود داشته و در افراد شاهد، مشاهده نگردید و Ab علیه باند ۳۱ کیلو دالتونی در سرم ۷ بیمار و ۲ شاهد وجود داشت.

انجام آنالیز آماری Fisher's exac, t test در مورد Ab ضد پروتئین ۴۳ کیلودالتونی بورلیا پرسیکا که در سرم ۷ بیمار وجود داشت و در افراد شاهد نبود اختلاف معنی داری بین بیماران و افراد شاهد نشان داد ($P = 0.0414$). در سایر موارد اختلاف معنی داری بین بیماران و افراد شاهد مشاهده نشد.

جدول ۱: تعیین فراوانی آنتی بادی بر علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا در سرم افراد بیمار و شاهد تحت مطالعه

وزن مولکولی باندها (KD)	بیمار	شاهد
۱۲۶-۲۵۱	۷	۱۰
۱۲۵	۵	-
۹۹-۱۲۴	۱۷	۱۹
۵۱-۱۰۰	۱۲	۲۹
۴۴-۵۰	۱۸	۲۴
۴۳	۷	-
۲۱-۴۲	۵	۲
۲۱	۷	۲
۲۳-۳۰	۱۳	۹

در بررسی CSF بیماران و گروه شاهد مشخص گردید که در ۲ نفر از بیماران Ab علیه پروتئین ۵۰ کیلودالتونی بورلیا پرسیکا و در ۴ بیمار علیه پروتئین ۵۳ کیلو دالتونی بورلیا پرسیکا وجود دارد و کلیه افراد شاهد فاقد Ab علیه پروتئینهای بورلیا پرسیکا بودند.

فراوانی وجود Ab علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا در CSF بیماران تحت مطالعه در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول ۲: تعیین فراوانی آنتی بادی بر علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا در CSF بیماران تحت مطالعه

وزن مولکولی باندها (KDa)	بیمار
۵۰	۲
۵۲	۲

در آزمایش وسترن بلات سرم و CSF بیماران و افراد شاهد کلیه نمونه‌ها از نظر وجود Ab علیه لیپوپروتئینهای سطحی بورلیا برگدورفری (OspA و OspD) منفی بودند.

بحث

MS یک بیماری پیچیده با علل ناشناخته است (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر نقش عوامل محیطی در ایجاد MS هستند (۵) که یکی از عوامل محیطی مطرح در اتیولوژی MS عفونت است (۴). در واقع عفونتها (ویروسی، پارازیتی، باکتریائی) به عنوان یکی از عوامل آغازگر بیماریهای خود ایمن مطرح هستند (۱۴). علیرغم تحقیقات متعدد تاکنون ویروس خاصی از بیماران MS جدا نشده است (۱) و تحقیقات انجام گرفته نشان می‌دهد که انگلها نیز نقشی در ایجاد MS ندارند (۴) اما مطالعات در مورد باکتریها نشان داده است که بعضی باکتریها مانند بورلیا می‌توانند در میلین زدائی نقش داشته باشند (۱).

طی سالهای اخیر ارتباط بیماری بورلیائی لایم و MS به دلیل وجود

شواهد مشترک آزمایشگاهی و علائم بالینی مشابه مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). لذا در این تحقیق از تکنیک وسترن بلات جهت بررسی ایمنی هومورال بیماران MS نسبت به دو لیپوپروتئین سطحی بورلیا برگدورفری به نامهای OspA و OspD و نیز توتال پروتئین بورلیا پرسیکا که شایعترین نوع بورلیا در ایران است استفاده شد.

در این پژوهش OspA به این دلیل که یکی از پروتئینهای اصلی غشاء خارجی بورلیا برگدورفری است (۱۶) و اکثر گونه‌های بورلیا برگدورفری OspA را بیان می‌کنند (۱۲)، مورد استفاده قرار گرفت. نقش OspA در بیماریزائی بورلیا برگدورفری مشخص شده است. این پروتئین باعث تسهیل حرکت اسپیروکتها شده و بورلیا را از تاثیر کمپلمان روده مبانی کند و تاثیر کمپلمان پستانداران هنگام گزیدگی و مکیدن خون حفظ می‌کند (۱۲). به علاوه وجود Ab ضد OspA در فاز اولیهٔ بیماری یا مرحلهٔ حاد موضعی (IgM) و در مرحلهٔ مزمن بیماری لایم (IgG) در سرم مبتلایان توسط محققین گوناگون گزارش شده است (۱۷). همچنین به علت خاصیت ایمنی زائی، OspA به عنوان واکسن مؤثر علیه بیماری لایم به کار می‌رود (۱۸).

دلیل استفاده از OspD این بود که در سال ۱۹۹۶ در تحقیقات یکی از مؤلفین مشخص گردید که IgG سرم بیماران MS قادر است به طور قوی فعالیت آنزیم میتوکندری انسان به نام NADH: Ubiquinone reductase را مهار نماید و انجام تست الیزا نشان داد که ۲۰درصد از بیماران MS واجد Ab ضدپپتید ۱۳ اسید آمینه‌ای که در ساختمان این آنزیم نقش دارد، هستند. بررسی بانک اطلاعات ژنی در پروتئینهای باکتریایی و ویروسی بیانگر این نکته بود که بورلیا برگدورفری در ژن OspD خود سکانسی مشابه ژن پپتید ۱۳ اسید آمینه‌ای فوق را دارد. اهمیت این مسئله بدین لحاظ است که برای اولین بار یک پپتید میتوکندریائی به عنوان کاندید انوآنتی‌ژن در بیماران MS مطرح شد و اگر این مسئله ثابت شود نقص در تولید انرژی میتوکندریائی و خستگی شدید در بیماری MS قابل توجیه است. لذا با توجه به واکنش متقاطع OspD و NADH: Ubiquinone reductase، بررسی وجود آنتی بادی علیه OspD در سرم و CSF و اثبات نقش بورلیا برگدورفری در ایجاد بیماری MS می‌تواند پاسخگوی بسیاری از مسائل موجود باشد (۱۹). OspD در باکتری Ecoli سویه BL۲۱ کلون شد و انجام تکنیک الیزا بر روی سرم بیماران نشان داد بیمارانی که دارای Ab علیه NADH: Ubiquinone reductase بودند نسبت به OspD نیز واکنش نشان دادند. اما چون در تعدادی از سرمهای کنترل منفی نیز واکنش دیده شد، لازم بود تا تکنیک دقیق‌تری برای ارزیابی تقلید مولکولی گزارش شده بین NADH: Ubiquinone reductase و OspD استفاده گردد (۱۹).

از بین تکنیکهای موجود، وسترن بلات قابل قبول‌ترین تست سنجش Ab است که به منظور تشخیص بیماری لایم انجام می‌گیرد (۲۰). در سال ۱۹۹۵ CDC[1] توصیه نمود تا تکنیک وسترن بلات بر روی تستهای مثبت یا مشکوک الیزا انجام شود (۲۱). تست وسترن بلات دارای حساسیت بالاتری از الیزاست و قبل از ماکزیمم شدن پاسخ Ab مثبت می‌شود (۲۰). سایر آزمونها از جمله کشت و بیوپسی در تشخیص بیماری لایم زیاد مؤثر نیستند (۲۲) و تکنیکهائی که بر اساس گزارش Ag یا DNA هستند مانند PCR و تسخیر آنتی ژن فقط می‌توانند در تشخیص اولیه بیماری مفید باشند (۲۰). لذا در این تحقیق از تکنیک وسترن بلات استفاده شد.

در این تحقیق به منظور سنجش پاسخ هومورال بیماران پس از انجام آزمایشات بر روی نمونه‌های سرم و CSF، مشخص گردید کلیه بیماران فاقد Ab علیه OspA و OspD هستند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که OspD ایمونوژن قوی نبوده و پاسخهای ایمنی سلولی را به خوبی تحریک نمی‌نماید؛ از طرفی پاسخ ایمنی هومورال بر علیه آن نیز اثر حفاظت بخش ندارد. در مدلهای موشی نیز واکسن OspD ایمنی بخش نمی‌باشد (۲۳). لذا ایمنی بخش نبودن آن، شایع نبودنش در تمام بورلیاها (۲۴) و متغیر بودن آن در سویه‌های مختلف به علت نوترکیبی که در ژن آن رخ می‌دهد (۲۴) می‌تواند تا حدودی عدم پاسخ به OspD را توجیه کند. تغییرات آنتی‌ژنی پروتئینهای سطحی بورلیا برگدورفری که مکانیسمی برای فرار از سیستم ایمنی میزبان است (۲۵) و عدم بیان OspA در تمام سروتیپهای برگدورفری (۲۶) می‌تواند از دلایل مشاهده نکردن پاسخ بر علیه OspA باشند. از طرفی به نظر می‌رسد که وجود گروه لیپیدی در ساختمان لیپوپروتئین OspA برای بروز خاصیت ایمنی زائی آن ضروری باشد (۲۷) و OspA تولید شده در E.coil فاقد لیپید است و مشاهده شده است که OspA نوترکیب به تنهائی هنگامی اثر ایمنی بخشی و تحریک سیستم ایمنی برای تولید آنتی‌بادیهای را دارد که با ادجونت و یا پروتئین P۶۶ که یک پروتئین غشاء درونی بورلیا برگدورفری است همراه باشد (۲۸). دلایل فوق می‌تواند علت عدم مشاهده پاسخ نسبت به OspA را در این مطالعه توجیه نماید.

در تحقیق حاضر در ۳۳ نمونه سرم و ۶ نمونه CSF بیماران MS وجود آنتی بادی علیه باندهای پروتئینی بورلیا پرسیکا نشان داده شد. از این تعداد Ab علیه سه پروتئین ۱۲۵، ۴۳ و ۳۱ کیلو دالتونی در بیماران با فراوانی زیادتر نسبت به کنترل وجود داشت. آنالیز آماری صحت فیشر اختلاف معنی داری در خصوص وجود Ab علیه پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی بین بیماران و افراد شاهد را نشان داد ($P = 0.0414$). اگر چه ماهیت این باند در حال حاضر مشخص نیست، لیکن باند ۳۱ کیلو دالتونی بورلیا پرسیکا احتمالاً مشابه باند ۳۱ کیلو دالتونی OspA از بورلیا برگدورفری است.

در آزمایش وسترن بلات آنتی بادی علیه باند ۳۱ کیلو دالتونی بورلیا پرسیکا در ۷ نفر از بیماران وجود داشت، اما آنتی بادی علیه باند OspA بورلیا برگدورفری موجود نبود و این مسئله احتمالاً به دلیل اختلاف در اپی توپهای این دو پروتئین و یا احتمالاً عدم وجود گروههای لیپیدی در OspA نوترکیب است (۲۷). در این تحقیق در بعضی از افراد نرمال نیز وجود آنتی بادی علیه باندهای پروتئین بورلیا پرسیکا گزارش شد که احتمالاً به دلیل وجود واکنش متقاطع بین بعضی از آنتی ژنهای بورلیا پرسیکا و فلور طبیعی بدن می‌باشد. بدیهی است

1. Center of Disease Control and Preventation

بعضی از باندهای مشاهده شده در واکنش سرمی افراد مبتلا به MS نیز به دلیل واکنش متقاطع آنتی ژنهای بورلیا با فلور طبیعی بدن می‌باشد، لیکن با توجه به یکسان بودن نسبی فلور طبیعی بدن در دو گروه بیماران و افراد شاهد که هر دو از یک جمعیت واحد انتخاب شده‌اند، مواردی که باند پروتئینی با سرم افراد مبتلا واکنش داده ولی با سرم افراد گروه کنترل واکنشی نمی‌دهد قابل ذکر و تعمق می‌باشند.

Karlsson (۲۹)، Halperin (۲۲) و Coyl (۳۰) در تحقیقات جداگانه‌ای وجود Ab علیه آنتی ژنهای بورلیا برگدورفری در سرم و CSF بیماران مبتلا به MS را مورد بررسی قرار داده‌اند. در مواردی نیز وجود Ab علیه پروتئینهای بورلیا برگدورفری در سرم یا CSF بیماران MS گزارش شده است (۳۰). نتایج به دست آمده توسط این محققین تا حدودی با نتایج ما همخوانی دارد اگر چه این محققین غالباً از تکنیک الیزا برای تشخیص وجود آنتی بادی استفاده نموده‌اند و تحقیقات نشان داده است که تکنیک الیزا فاقد دقت کافی برای سنجش Ab علیه بورلیا برگدورفری است و با به دست آمدن نتایج مثبت مشخص نمی‌شود که Ab علیه کدام باند پروتئینی وجود دارد (۲۰). اما در تحقیق حاضر وزن مولکولی باندهائی از پروتئین تام بورلیا پرسیکا که آنتی بادی علیه آنها وجود داشت مشخص گردید. از طرفی تاکنون گزارشی از بررسی پاسخ ایمنی مبتلایان به MS بر علیه بورلیا پرسیکا که گونه شایع در ایران است گزارش نشده است.

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و تحقیقات دیگری که توسط سایر محققین در مورد ارتباط بیماری MS و بورلیا صورت گرفته است و با توجه به شباهتهای زیادی که بین علائم کلینیکی، پاتوژنز و ضایعات پاتولوژیک لایم و MS مشاهده می‌شود و همچنین هم پوشانی جغرافیائی مناطق شیوع این دو بیماری (۳۰)، می‌توان گفت که شواهدی از وجود ارتباط این دو بیماری از نظر عامل به وجود آورده‌اند و یا شروع کننده وجود دارد. به ویژه که طی سالهای اخیر خود ایمن شدن بیماری لایم مزمن مطرح شده است. مطالعه مدلهای حیوانی بیماری لایم، حمله مستقیم اسپیروکتها به بافت عصبی و نیز واکنشهای خود ایمن علیه آنتی ژنهای نورال را تائید می‌کند (۳۱)، فرضیه تقلید مولکولی نیز می‌تواند بیماری مزمن در اثر بورلیا برگدورفری را توجیه نماید، احتمالاً پاسخ میزبان به شاخصهای خودی که تشابهات ساختاری با آنتی ژنهای اسپیروکتی دارند می‌تواند منجر به ضایعات التهابی مزمن و آسیب به بافتها شود. لذا ممکن است تشابه بیماری لایم مزمن و MS مربوط به منشاء خودایمنی هر دو بیماری باشد (۳۲).

برای روشن نمودن این مسأله می‌توان از مدلهای حیوانی استفاده نمود که در مورد بیماری لایم درگیری CNS و بروز علائم نورولوژی توسط کشت و PCR ثابت شده است (۳۳) و در مورد بورلیا پرسیکا نیز این تحقیق در حال حاضر در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی در حال انجام است.

با وجود اینکه پاتوژنز مسئول بیماری اسکروز مولتیپل، صدمات نسجی حاصل از ایمنی سلولی و پروفایل سایتوکینی تیپ ۱ (Th1) می‌باشد، ولی آنتی بادیهای ضد بورلیا می‌توانند آغازگر تخریب بافتی باشند. در نهایت باید اذعان نمود که تحقیقات اخیر برای اثبات نقش بورلیا به عنوان یک عامل عفونی در شروع پاسخهای خودایمن در بیماران مبتلا به MS کافی نیستند و برای روشن نمودن نقش بورلیا در ایجاد MS انجام تحقیقات تکمیلی ضروری به نظر می‌رسد، که با توجه به نقش مهم و تعیین کننده پاسخهای ایمنی سلولی در پاتوژنز بیماری MS بررسی شاخصهای پاسخ ایمنی سلولی بر علیه آنتی ژنهای بورلیا در مبتلایان به MS می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد.

References

1. Kaye EM: Disorders primarily affecting white matter. In: Pediatric neurology principles and practice (Swaiman KF and 1 Ashwal S, eds) 3rd ed, U.S.A.: Mosby Inc, 1999; 849-851
2. Eein GC, Bernard C: Insights to the aetoilogy and pathogenesis of multiple sclerosis. Immunol. Cell Biol, 1998; 76: 47-54
3. Giovannoni G: The immunopathogenesis of multiple sclerosis. Baillieres Clin. Neurol 1997; 6: 387-407
4. Murrell TGC, Harbige LS, Robinson IC: A review of the aetiology of multiple sclerosis: an ecological approach. Immunol Cell Biol 1991; 18: 95-112
5. Hogancamp WE, Rodringuez M, Weinshenker BG: The epidemiology of multiple sclerosis. Mayo Clin Proc 1997; 72: 871-878, 1997
6. Marshall V: Multiple sclerosis is a chronic central nervous system infection by a spirochetal agent. Med Hypotheses, 1988; 25: 89-92
7. Casetta I, Granieri E: Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. J. Neurovirol, 2000; 6: S 147-51
8. Goverman J, Brabb T, Paez A, Harrington C, Dassow PV: Initation and regulation of CNS autoimmunity. Crit Rev Immunol 1997; 17: 469-480
9. Van Noort JM, Bajramovic JJ, Plomp AS, Van stipdonk MJ: Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin directed autoimmunity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol, 2000, 105: 46-57
10. Storthe G, Read C, Mersea W, Essex C: Is multiple sclerosis caused by an oral spirochaete? Lancet, 1986; 12: 75-78
11. Steere AC: Lyme disease: a growing threat to urban populations. Pro Natl Acad Sci, 1994; 91: 2378-2383

12. Johnson RC: Borrelia In: Topley and wilson, s microbiology and microbial infecctions (Balow SA, Duerden BR, eds), 9th ed, USA: Oxford Inc. 1998, pp: 1277-1284

۱۳. عریضی فرزادک تشخیص آنتی ژن فلاژن بورلیا پرسیکا و تعیین درجه حساسیت و ویژگی آن نسبت به آنتی ژن کامل سلولی. پایان نامه اخذ کارشناسی ارشد، رشته باکتری‌شناسی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، ۱۳۷۶

14. Cunninghom M: Bacterial antingen mimicry. In: The molecular pathology of autoimmune diseases (Bona A, et al eds) 1st, ed, Switzerland: Harward Academic Publish 1993, pp: 245-256

15. Prasad A. Hanson R: 10 questions about lyme neuroborreliosis. Comp Thet. 1998; 24: 415-420

16. Schubach WH, Mudri S, Dattwyler RT, Luft BJ: Mapping Antibody binding domains of the major outer surface membrane protein (OspA) of Borrelia burgdorferi. Infect Immun, 1991; 59: 1911-1915

17. Jian GW, Luft BJ, Munoz P, Dattwylei RJ, Gorevic P: Cross antigenicity between the major surface proteins (OspA and OspC) and other proteins of Borrelia burgdorferi. J Immunol 1990; 144: 284-289

18. Haake DA: Spirochaetal Lipoproteins and pathogenesis. Mic 2000; 146: 1491-1504

19. Sanati MH: Cloning and characterisation of a novel mitochondrial autoantigen associated with multiple sclerosis. Ph.D. tesis, Mudroch University, School of Biological and Environmental Sciences, Western Australia. 1996

20. http: //www. igenex. Com/ labtest. Htm 1998

21. Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B: Laboratory evaluation in the diagnosis of lyme disease. Ann Intern Med 1997; 127: 1109-1123

22. Halperin JJ, Volkman DJ, Wu P: Central nervous system abnormalities in lyme neuroborreliosis. Neurology, 1991; 41: 1571-1582

23. Probert WS, Le Febrke RB: Protection of C3H/HeN mice from challenge with Borrelia burgdorferi through active immunization with OspA, OspB or OspC, but not OspD or the 83-kilodalton antigen. Infect Immun 1994; 62: 1920-1926

24. Marconi RT, Samuels S, Landry RK, Garon CF: Analysis of distribution and molecular heterogenecity of the OspD gene among the lyme disease spirochetes: evidence for lateral gene exchange. J Bacteriol 1994; 176: 4572-4581

25. Dorwars DW, Schwan TG, Garon CF: Immune capture and detection of Borrelia burgdorferi antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. J Clin Mic, 1991; 29: 1162-1170

26. Wilske B, Anderson JF, Baranton G, Barbour AG, Hovind Hougen K: Taxonomy of borrelia spp. Scand J Infest Dis, 1991; 77: 108-129

27. Weis JJ, Ma Y, Erdile LF: Biological activities of naive and recombinant Borrelia burgdorferi outer surface protein A, dependence on lipid modification. Infect Immun 1994; 62: 4632-4636

28. Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (P66) of Borrelia burgdorferi is hindered by Osp lipoproteins. Infect Immun 1999; 67: 2874-2883

29. Karlsson M: Western immunoblot and flagellum enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of lyme borreliosis. J Clin Mic 1990; 28: 2148-2150

30. Coyle PK, Krupp LB, Doscher C: Significance of reactive lyme serology in multiple sclerosis. Ann Neurol 1993; 34:745-747

31. CoylePK: Neurological lyme disease: is there a true animal model? Ann Neurol 1995; 38: 560-562

32. Szczepanski A, Benach JI: Lyme borreliosis: host responses to Borrelia burgdorferi. Mic Rev, 1991; 55: 21-34

33. Pachner AR, Delaney E, O neill T: Neuroborreliosis in the nonhuman primate. Borrelia burgdorferi persists in the central nervous system. Ann Neurol, 1995; 38: 667-669