www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 60, No. 3 P: 494-502
July-Aug 2017

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۰، شماره ۳
مرداد – شهریور۹۶، صفحه ۵۰۲-۴۹۴

مقاله اصلی

بررسی ارتباط بین مورفه آ و سیتومگالوویروس در یک مطالعه مقطعی

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۰۱- تاریخ پذیرش:۹۶/۰۵/۰۱

یلدا ناهیدی[۱]
ناصر طیبی میبدی[۲*]
زهرا مشکات[۳]
مریم صالحی[۴]
فاطمه فرهنگدوست[۵]

۱- دانشیار بیماری‌های پوست، مرکز تحقیقات سالک جلدی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد آسیب شناسی، مرکز تحقیقات سالک جلدی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳- دانشیار ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴- دانشیار پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات ایمنی بیمار، مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان قائم(عج)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۵- متخصص آسیب شناسی، مشهد، ایران.

* مرکز تحقیقات سالک جلدی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۰۵۱۳۸۰۲۲۲۱۰
Email: tayebin@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه

اسکلرودرمی موضعی، جزئی از طیف بیماری‌های اسکلروتیک است که به طور اولیه پوست را تحت تاثیر قرار می‌دهد و شایع‌ترین آن‌ها مورفه آ می‌باشد. تا به حال علل و پاتوژنز مورفه آ به طور کامل شناخته نشده است اما فرض بر این است که یک فرایند چند عاملی باعث شروع آبشار التهابی و فیبروتیک می‌شود. عوامل محیطی احتمالی دخیل شامل بیماری لایم، تروما، پرتوتابی، داروها و عفونت‌های ویروسی است که از میان عوامل عفونی، به سایتومگالوویروس اشاره شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین بیماری مورفه آ و سایتومگالوویروس است.

روش کار

در این مطالعه مقطعی دو گروهی روی ۴۱نمونه از بافت پارافینه بیماری مورفه آ تایید شده و ۴۰ نمونه پوست سالم، تکثیرDNA سایتومگالوویروس به وسیله PCR ردیابی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار spss (نسخه۱۶) آنالیز و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درنظرگرفته شد.

نتایج

از ۸۱ بیمار ۱۳ نفر مذکر (۱۶/۱ ٪) و ۶۸ نفر مونث (۸۳/۹ ٪) بودند. کمترین و بیشترین سن بیماران به ترتیب۱۱ و ۷۲ سال و میانگین سنی ۴۱/۶ سال بود. از بین ۸۱ نمونه بتاگلوبین مثبت، CMV DNA تقریبا در تمام نمونه‌های مورفه آ و پوست سالم یافت شد و فقط یک مورد(۲/۴ ٪) از گروه مورد و ۲ نمونه(۵٪) از گروه شاهد از نظر CMV DNA منفی شد (p=۰/۶۱).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ارتباط آماری معنی‌داری بین تکثیر ژن سایتومگالوویروس با بیماری مورفه آ یافت نشد.

کلیدواژه ها

بیماری مورفه آ، سایتومگالوویروس،PCR

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

اسکلرودرمی موضعی جزئی از طیف بیماری‌های اسکلروتیک است که به طور اولیه پوست را تحت تاثیر قرار میدهد و برحسب زیر گروه ممکن است بافت های مجاور مانند چربی، عضله، فاسیا و استخوان را درگیر کند.دراین بیماری برخلاف اسکلروز سیستمیک، درگیری ارگان های داخلی یا پدیده رینود دیده نمی‌شود (۲-۱).

شایع‌ترین زیر گروه اسکلرودرمی موضعی، مورفه آ با بروز آن۰/۴تا ۲/۷ در ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد. شیوع بیماری در بزرگسالان و کودکان برابر است وتقریبا ۹۰٪ اطفال بین ۲ تا ۱۴ سال سن دارند اما متوسط سن بروز بیماری در بزرگسالان بین ۴۰ تا ۵۰ سال است. بیماری در زنان شایع‌تر است. نوع پلاکی مورفه آ شایعترین نوع درگیری در بزرگسالان و مورفه آی خطی شایعترین نوع در اطفال می‌باشد (۳).

تا به حال علل و پاتوژنز مورفه آ به طور کامل شناخته نشده است اما فرض بر این است که ترکیبی از عوامل ژنتیکی و سپس مواجهه با عوامل محیطی باعث شروع آبشار التهابی و فیبروتیک می‌شود؛ عوامل محیطی احتمالی مطرح شده پرتوتابی، داروها تروما، و عوامل عفونی می‌باشند که از میان عوامل عفونی، بورلیا بورگدورفری و سایتومگالوویروس را می‌توان نام برد(۲). این ویروس می‌تواند باعث ایجاد عفونت و آسیب سلول‌های اندوتلیال و افزایش ماکروفاژها شود و نهایتا افزایش بروز TGFß و اختلال تنظیم سیستم ایمنی (افزایش بروز لنفوسیت-های B) را سبب گردد که مشابه تغییرات موجود در ضایعات مورفه آ می‌باشد. در بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک نیز افزایش سطوح آنتی بادی های ضدCMVدر مقایسه با جمعیت عمومی مشاهده شده است (۳).

ماگرو در پژوهش خود بر روی ۷بیمار با تظاهرات اختلال بافت همبندی شامل ۴ بیمار دارای تظاهرات واسکولیت جلدی و۳ بیمار مبتلا به اسکلرودرمی، در تمام بیماران IgM ضد CMV و یا DNA ویروس در خون محیطی را نشان دادند (۴). در مقابل در مطالعه Obtsuka با بررسی شیوع CMV در نمونه‌های پوستی بیماران اسکلروز سیستمیک با استفاده از PCR فرضیه نقش CMV به عنوان علت اسکلروز سیستمیک را تایید نکردند (۵).

در مطالعه‌ی لوناردی بر روی ۸۱ بیمار مبتلا به اسکلروز سیستمیک Ig-G ضد پپتیدی به نام UL_{94} را در سرم بیماران نشان دادند که این پپتید بین آنتی ژن‌های خودی در سطح سلول‌های اندوتلیال و CMV مشترک است و در واقع نوعی اتوآنتی بادی محسوب میشود که میتواند در پاتوژنز این بیماری دخیل باشد (۶).

علیرغم تفاوت‌هایی که در بالین بین مورفه آ و اسکلروز سیستمیک وجود دارد این دو بیماری مسیرهای التهابی و ایمونولوژیک مشترکی دارند که در نهایت منجر به آسیب عروقی، افزایش تولید کلاژن و تکثیر ماتریکس خارج سلولی در هر دو وضعیت می‌شود (۷). و از طرفی تغییرات ایجاد شده توسط CMV در سلول‌های اندوتلیال و سیستم ایمنی مشابه تغییرات مشاهده شده در ضایعات مورفه آ می‌باشد(۳). با توجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای CMV را به عنوان یک عامل اتیولوژیک در مورفه آ ارزیابی نکرده است، مطالعه حاضر به بررسی همراهی سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ با استفاده از روش PCR می‌پردازد.

روش کار

دراین مطالعه مقطعی گذشته نگر با روش نمونه‌گیری غیر احتمالی و مبتنی برهدف با توجه به نبودن مطالعات قبلی حجم نمونه به صورت پایلوت ۴۱ مورد بیماری مورفه آ و۴۰ مورد پوست سالم حاشیه نووس‌های ملانوسیتی حذف شده از میان بلوک‌های پارافینی موجود در بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان‌های امام رضا(ع) و قائم (عج) انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل بلوک‌های پارافینی موجود در آرشیو بخش آسیب‌شناسی با تشخیص بالینی و آسیب‌شناسی بیماری مورفه آ ومعیارهای خروج از مطالعه شامل بیماران با پرونده ناقص، بلوک‌های با میزان بافت ناکافی و نیز نمونه‌هایی

که PCR ژن بتاگلوبین آن‌ها منفی بود و کیفیت لازم برای انجام PCR نداشتند بود. به‌عنوان گروه کنترل نیز از نمونه‌های پوست سالم افرادی که جهت حذف نووس مراجعه کرده بودند و از نظر سن و جنس با بیماران همسان بودند و مبتلا به بیماری بافت همبند نبودند، انتخاب شدند.

ابتدا با مراجعه به دفاتر بایگانی بخش آسیب‌شناسی ۶۰ نمونه مورفه آ و ۶۰ نمونه پوست سالم حاشیه نووس ملانوسیتی انتخاب و مورد بازبینی قرارگرفت. ازبلوک‌های دارای بافت کافی و با تشخیص قطعی مورفه آ و نیز نمونه‌های پوست سالم گروه کنترل، ۵ برش ۲۰ میکرومتری در شرایط استریل تهیه شد و پس از قرار دادن در لوله‌های اپندورف استریل به مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی بیمارستان قائم (عج) انتقال داده شد. مراحل پارافین زدایی، استخراج DNA و PCR انجام شد. اطلاعات دموگرافیک و بالینی شامل سن، جنس و محل ضایعه هر بیمارنیز با استفاده از پرونده آنان جمع‌آوری شد.

پارافین زدائی: در این پژوهش از روش زایلول/اتانول به منظور پارافین زدایی از بافت‌های پارافینه استفاده شد. ۱ میلی لیتر زایلول به لوله‌های اپندروف حاوی برش‌های بافتی اضافه شد و به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در مرحله بعد میکروتیوب در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی آن خارج شد. مراحل ۱و۲ تکرار شد. ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰٪ به رسوب حاصل اضافه شد و پس از چندین بار وارونه کردن میکروتیوب در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی خارج شد. این مرحله دوباره تکرار شد. رسوب حاصل در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا اتانول آن کاملا خارج شود (رسوب نباید کاملا خشک شود).

استخراج DNA: استخراج DNA توسط کیت Bio Basic INC ساخت کانادا صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Lysis – Buffer - T) و ۱۰ میکرولیتر پروتئینازK به هر میکروتیوب اضافه شد و با یکدیگر مخلوط شد. نمونه‌ها به بافر اضافه شد و از مخلوط شدن آن‌ها اطمینان حاصل شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نمونه‌ها مجددا جهت غیر فعال سازی پروتئینازK در ۹۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر Universal NST به محلول اضافه شد سپس ده بار سر و ته شد. در نهایت مخلوط حاصله مستقیما جهت انجام PCR استفاده شد.

PCR: پس از استخراج DNA از نمونه‌های بلوک پارافینه، با استفاده از پرایمرهای ژن بتاگلوبین کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده تعیین شد. پرایمرهای بتا گلوبین GH20 و PC04 (شرکت سیناژن ایران) استفاده شد که قطعه‌ای به طول ۲۶۰جفت باز را تکثیر می‌کنند و توالی آن‌ها به شرح زیر می‌باشد:

GH20: 5́ GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3́

PC04: 5́ CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3́

نمونه‌هایی که با استفاده از پرایمرهای مورد نظر قطعه ۲۶۰ جفت باز را تولید کرده بودند به عنوان نمونه مطلوب در نظرگرفته شدند و برای انجام ادامه تحقیق و تکثیر ژن CMV مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی وجود توالی سایتومگالوویروس درDNA های استخراج شده ازبافت‌های پارافینه:

۱۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی تکثیر یافته در ژل آگاروز۲٪ بدون اضافه کردن بافر، بارگذاری شد و قطعات DNA در ژل آگاروز براساس اندازه، وزن وشکل فضایی از هم جدا شده و به دلیل داشتن بار منفی تحت جریان الکتریکی از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند سپس با رنگ گرین ویوور رنگ آمیزی شده وبرای ردیابی قطعهCMV با ۲۲۲ جفت باز مورد ارزیابی قرار گرفت.

بعد از انجام PCR بر روی ژن سایتومگالوویروس به دلیل مثبت بودن نتیجه اکثر نمونه‌ها، جهت رد آلودگی دوباره تکرار تست صورت گرفت و در این نوبت محل استخراج DNA و انجام PCR تغییر داده شد و بعد از تکرار نتایج قبلی جهت اطمینان بیشتر برای نوبت سوم تست‌ها در محل دیگر و با کیت دیگری تکرار شدند و جهت ارزیابی صحت روش کار از نمونه‌های کنترل مثبت و منفی کیت استفاده گردید.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه۱۶) انجام شد.

توصیف داده‌ها با استفاده از جداول فراوانی و نمودار انجام شد و مقایسه متغیرهای کیفی بین گروه مورد و شاهد از طریق آزمون کای دو و تست دقیق فیشرصورت گرفت .

نتایج

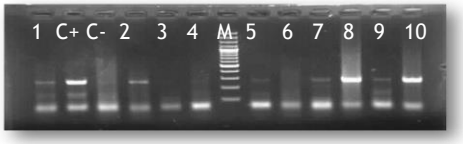
در مطالعه حاضر که به روش گذشته نگر انجام شد از بلوک‌های برداشت پوستی ۶۰ بیمار مبتلا به مورفه آ به عنوان مورد و از نمونه پوستی ۶۰ فرد سالم (که به منظور حذف نووس به درمانگاه پوست مراجعه کرده بودند) به عنوان شاهد استفاده شد. سپس از این تعداد، ۴۱ بلوک مورد و ۴۰ بلوک شاهد مناسب (براساس PCR ژن بتاگلوبین) جهت PCRاز نظر ژنوم CMVانتخاب شد.

از مجموع ۴۱ مورد، ۳۴ نفر مونث (٪۸۳) و ۷ نفر مذکر(٪۱۷) و از ۴۰ نمونه شاهد، ۳۴ نفر(٪۸۵) مونث و ۶ نفر(٪۱۵) مذکر بودند و دو گروه مورد و شاهد از نظر جنسیت مشابه بودند($p > ۰/۹۹$).

در ۴۱ مورد، کمترین و بیشترین سن بیماران به ترتیب ۱۲ و ۷۲ سال، میانگین سنی ۱۶/۴ ± ۴۳/۵ سال بود. در ۴۰ شاهد، کمترین و بیشترین سن بیماران به ترتیب ۱۱ و ۷۱ سال، میانگین سنی ۱۵/۱ ± ۳۹/۶ سال بود. بین دو گروه مورد و شاهد از نظر میانگین سنی تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت بدین معنی که دو گروه از نظر متغیر سن مشابه بودند ($p=۰/۵۶$).

از ۴۱ بیمار مبتلا به مورفه آ، در ۲۴ نفر(۵۸/۵ ٪) ابتلا غالبا در تنه و در ۱۷ نفر (۴۱/۵ ٪) در اندام‌ها بود ودر سر و گردن درگیری وجود نداشت.

در مجموع از ۶۰ بلوک پارافینی گروه مورد ۴۱ نمونه(۶۸/۳ ٪) و از ۶۰ نمونه بلوک گروه شاهد ۴۰ نمونه(۶۶/۶ ٪) از نظر ژن بتاگلوبین مثبت بودند (شکل۱).



شکل ۱. نتایجPCRژن بتاگلوبین، قطعه تکثیر شده یک باند ۲۶۰ جفت بازی است که در نمونه های۱، ۲،۷، ۸، ۹و ۱۰ دارای تکثیر و در۳، ۴، ۵ و ۶ فاقد تکثیر است؛ M سایز مارکر DNA، c^+کنترل مثبت وc^- کنترل منفی می باشد.

از لحاظ وجود ژن سایتومگالوویروس، از ۴۱ بیمار مورفه آ، ۴۰ مورد دارای ژنوم و ۱ مورد فاقد ژنوم بودند. از ۴۰ نمونه شاهد نیز، ۳۸ عدد دارای ژنوم و ۲ عدد فاقد ژنوم سایتومگالوویروس بودند. نمونه‌ای از تکثیر ژن سایتومگالوویروس با روش PCR در شکل ۲ نشان داده شده است از مجموع ۴۱ بلوک مورد، ۴۰ نمونه(۹۷/۶ ٪) دارای تکثیر و ۱ نمونه(۲/۴ ٪) فاقد تکثیر ژنوم سایتومگالوویروس و از ۴۰ بلوک شاهد نیز،۳۸ نمونه(٪۹۵) دارای تکثیر و ۲ نمونه(٪۵) فاقد تکثیر ژنوم CMV بودند اما ارتباط آماری معنی‌داری بین وجود ژن سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ در آزمون کای اسکوئر وجود نداشت ($p=۰/۶۱$) (جدول۱) (شکل۲).

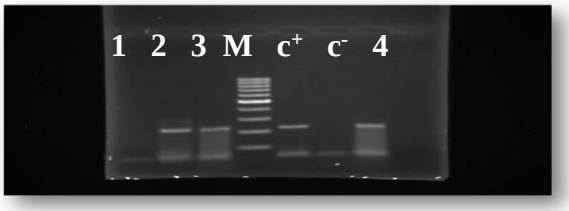
جدول ۱. ارتباط بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس با بیماری مورفه آدر موارد مثبت برای تکثیر ژن بتاگلوبین

	CMV^-	CMV^+	مجموع
مورد	۱(٪ ۲/۴)	۴۰(٪ ۹۷/۶)	۴۱(٪۱۰۰)
شاهد	۲(٪۵)	۳۸(٪۹۵)	۴۰(٪۱۰۰)

از لحاظ تکثیر ژن سایتومگالوویروس از مجموع ۴۱ بلوک مورد۱۲ نمونه از هرکدام ازگروه های سنی ۱۱- ۳۱ سال و ۳۲- ۵۱ سال و نیز ۱۶ نمونه از گروه سنی ۵۲ – ۷۲ سال دارای تکثیر بودند و از ۴۰ بلوک شاهد نیز، ۱۲ نمونه از گروه سنی ۱۱- ۳۱، ۱۷ نمونه از گروه سنی ۳۲ – ۵۱ سال و ۹ نمونه از گروه سنی ۵۲ –۷۲ سال دارای تکثیر بودند اما ارتباط آماری معنی داری بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس با گروه‌های سنی با استفاده از تست کای اسکوئر وجود نداشت ($p=۰/۳۳$). بعد از مشاهده عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین دو متغیر در هر دو حالت فوق رابطه میانگین سنی دو گروه مورد و شاهد (بدون درنظر گرفتن گروه-های سنی) با وجود ژنوم سایتومگالوویروس با استفاده از Independent T test بررسی شد که این رابطه آماری نیز معنی‌دار نبود($p=۰/۷۸$).

از لحاظ وجود ژن سایتومگالوویروس از مجموع ۴۱ بلوک مورد ۲۳ نمونه از تنه و ۱۷ نمونه از اندام‌ها دارای تکثیر بودند و از ۴۰ بلوک شاهد نیز، ۲۴ نمونه از سروگردن، ۸ نمونه از تنه و ۶ نمونه از اندام‌ها دارای تکثیر بودند اما ارتباط معنی‌داری بین

محل درگیری با وجود ژنوم سایتومگالوویروس وجود نداشت(p >۰/۹۹).



شکل ۲. نتایج PCR ژن سایتومگالوویروس، قطعه تکثیر شده یک باند ۲۲۲ جفت بازی است که در نمونه های ۲، ۳ و ۴ دارای تکثیر و در نمونه ۱ فاقد تکثیر است؛M سایز مارکر DNA، c^+کنترل مثبت وc^- کنترل منفی می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر ژنوم سایتومگالوویروس در۹۷/۶٪ از بیماران مورفه آ و ۹۵٪ گروه شاهد مثبت شد؛گرچه از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ وجود نداشت(p=۰/۶۱). و براساس یافته حاضر این ویروس در پاتوژنز مورفه آ دخالتی ندارد.

اتیوپاتوژنز مورفه آ تاکنون به طور کامل شناخته نشده است. رخداد مورفه آ یک فرایند مولتی فاکتوریال به نظر می-رسد.عواملی که در پاتوژنز آن دخیل دانسته شده‌اند تروما، رادیاسیون، دارو، عفونت‌ها، خود ایمنی و میکرو کیمریسم می-باشند. عوامل عفونی مطرح شده بورلیا بورگدورفری و سیتومگالوویروس می‌باشند(۳).

سایتومگالوویروس با آلودگی سلول‌های اندوتلیال به آن‌ها آسیب می‌رساند؛ علاوه بر آن تکثیر سلول‌های کشنده طبیعی در پاسخ به عفونت CMV باعث صدمه عروقی و نیز باعث شروع روند فیبروز می‌شود(۸). مکانیسم دیگری که می‌تواند سبب تحریک سیستم ایمنی علیه سلول‌های اندوتلیال شود، وجود تشابه مولکولی بین پروتئین UL_{94} مربوط به ویروس CMV با NAG-2، مولکول سطحی سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست-های درم است که مسئول واکنش متقاطع آنتی بادی‌های ضد CMV علیه این دو نوع سلول می‌باشد(۷). عفونت اولیه یا دوباره فعال شدن سایتومگالوویروس به سبب عفونت فیبروبلاست‌ها می‌تواند پروسه فیبروز را فعال کند(۸). در بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک نیز افزایش سطوح آنتی بادی‌های ضدCMV در مقایسه با جمعیت عمومی مشاهده می‌شود اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای CMV را به عنوان یک عامل اتیولوژیک در مورفه آ ارزیابی نکرده است (۳). علیرغم وجود تفاوت در بالین بین مورفه آ و اسکلروز سیستمیک این دو بیماری مسیرهای التهابی و ایمونولوژیک مشترکی دارند که در نهایت منجر به آسیب عروقی، افزایش تولید کلاژن و تکثیر ماتریکس خارج سلولی در هر دو وضعیت می‌شود (۷). وَنگ[1] خانمی ۲۱ ساله و مورد شناخته شده بیماری گریوز را با رخداد ناگهانی مورفه آ خطی در اندام تحتانی در سه ماهه اول حاملگی گزارش نمود که Ig M ضد سایتومگالوویروس در سه ماهه اول بارداری در وی مثبت بوده و در بررسی هیستوپاتولوژی پوست بیمار، هیالینیزاسیون درم با انفیلترای دور عروقی سطحی و عمقی لنفوسیت همراه با گسترش به چربی زیر جلد و فیبروز مشاهده شده است. در نهایت نتیجه گرفت که بیماری مورفه آ ممکن است متعاقب بارداری، بیماری‌های تیروئیدی و یا عفونت سایتومگالوویروس ایجاد شود (۹).

در مطالعه ماگرو و همکارانش در دانشگاه کورنل نیویورک ۷ بیمار با تظاهرات اختلال بافت همبندی شامل ۴ بیمار با تظاهرات واسکولیت جلدی و ۳ بیمار اسکلرودرمی از نظر CMVبررسی شدند. در تمام بیماران Ig-M ضد CMV و یا DNA ویروس در خون محیطی مثبت بود گرچه هیچ انکلوزیون CMV دیده نشد اما در مطالعات هیبریدیزاسیون درجا بروز mRNA به صورت بسیار کانونی با قرارگیری عمده در اندوتلیوم مشاهده شد.در نهایت این مطالعه نتیجه گرفت که دوباره فعال شدن عفونت CMV ممکن است یک محرک بالقوه برای شروع ناگهانی سندرم های آسیب میکروواسکولار با پایه ایمنی باشد. این ویروس می‌تواند باعث ایجاد عفونت و آسیب سلول‌های اندوتلیال و افزایش ماکروفاژها شود و نهایتا افزایش بروز TGF_{β} و اختلال تنظیم سیستم ایمنی (افزایش بروز لنفوسیت-های B) را سبب گردد که مشابه آن در ضایعات اسکلرودرمی هم دیده می شود (۴).

[1] Wong

در مطالعه حاضر ژنوم سایتومگالوویروس در ۹۷/۶ ٪ از بیماران مورفه آ و ۹۵٪ گروه شاهد مثبت شد؛گرچه از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ وجود نداشت (p=۰/۶۱).

اما همراهی بالای ژنوم این ویروس در هر دو نمونه مورفه آ وشاهد را به دو صورت می‌توان تفسیر نمود:

۱-آلودگی در طی مراحل انجام PCR که به سه دلیل این فرضیه رد می شود:

الف) سه بار PCR در سه محل متفاوت و با سه کیت مجزا تکرار شده و نتایج مشابهی ایجاد کرده است.

ب) در سه مورد تکثیر ژن بتاگلوبین وجود داشته اما تکثیر ژن سایتومگالوویروس منفی می باشد.(۱ عدد در شاهد و ۲ عدد درمورد)

ج) استفاده از کنترل مثبت و منفی کیت که در هر نوبت استفاده جوابهای صحیحی مشاهده شده است.

۲- شیوع بالا سایتومگالوویروس در جامعه: از ۸۱ نمونه مورد و شاهد در ۷۸ نمونه (۹۶/۲ ٪) ژنوم سایتومگالوویروس یافت شد. در مطالعه‌ای که دکتر مصطفوی و همکارانش در اصفهان بر روی نمونه‌های سرمی انجام دادند شیوع کلی سایتومگالوویروس در همه گروه‌های سنی را ۹۸/۲ ٪ گزارش کردند (۱۰). در پژوهشی که باقری و همکارانش در گناباد انجام دادند ۲۴۰ نمونه سرمی از خانم‌های باردار (سه ماهه سوم) جمع آوری شد سپس سطح Ig-G و Ig-M ضد سایتومگالوویروس با ELISA بررسی شد و در نهایت در ۷۲/۱ ٪ از زنان باردار Ig-Gضد سایتومگالوویروس مثبت بود (۱۱). در مطالعه‌ای که استفانی و همکارانش در ایالات متحده آمریکا انجام دادند شیوع عفونت سایتومگالوویروس از طریق ارزیابی سطح سرمی آنتی بادی ضد این ویروس در افراد با سن ۶ سال یا بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها شیوع عفونت را ۵۸/۹ ٪ برآورد کردند و نتیجه گرفتند که شیوع عفونت با افزایش سن افزایش می‌یابد به طوری که طیف وسیعی از ۳۶/۳ ٪ در ۶ - ۱۱ سالگی تا ۹۰/۸ ٪در سنین بیشتر از ۸۰ سالگی وجود دارد (۱۲). در مطالعه دیگری که فرناندو و همکارانش در ایالات متحده آمریکا انجام دادند میزان عفونت سایتومگالوویروس را در ۱۲-۴۹ سالگی ۱/۶ به ازای هر ۱۰۰ نفر در سال (شیوع ۹۵٪) تخمین زدند (۱۳). با توجه به تمایل بالای سایتومگالوویروس به آلوده کردن لنفوسیت‌های T، سلول‌های اندوتلیوم و فیبروبلاست‌ها شاید علت تعداد زیاد موارد مثبت در این مطالعه، وجود ژن نهفته CMV در ژنوم این سلول‌ها باشد؛(۱۵-۱۴) با این حال تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد فراوانی وجود ژنوم CMV در نمونه-های بافتی پوست در جمعیت ایرانی انجام نشده است. در مطالعه‌ای Obtsuka در توکیوCMV DNA را با روش PCR در نمونه‌های پوستی ۴ تا از ۴۸ بیمار با اسکلروز سیستمیک و۵ تا از ۹۷ فرد سالم مثبت بود و تفاوت آماری معنی داری بین دو گروه وجود نداشت بنابراین از فرضیه CMV به عنوان علت اسکلروز سیستمیک حمایت نشد که این نتیجه نیز مشابه نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد (۵).

در مطالعه جانت پاپ و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میزان عفونت‌های باکتریال و ویروسی در اسکلرودرمی با سایر اختلالات عضلانی- اسکلتی غیر التهابی مقایسه شد. در این مطالعه ۸۳ بیمار با اسکلروز سیستمیک و ۳۵۱ بیمار مبتلا به بیماری‌های عضلانی اسکلتی به عنوان کنترل (مبتلا به آرتریت زانو، تاندونیت یا فیبرومیالژی) انتخاب شدند و سابقه قبلی عفونت، تماس با عوامل عفونی در طی ۱ سال گذشته، واکسیناسیون و ضربه در آن‌ها مشخص شد. نتایج بدست آمده هیچگونه ارتباطی را بین انواع عفونت و اسکلروز سیستمیک اثبات نکرد؛ در واقع در گروه کنترل میزان بیشتری از سابقه عفونت (در طی ۱ سال قبل از تشخیص) و ضربه وجود داشت که این عفونت‌ها شامل انواع استرپتوکوکی، اسهال عفونی وعفونت نیازمند مصرف آنتی بیوتیک بود گرچه این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. سابقه هر نوع عفونت باکتریایی(مانندتوبرکلوز) و یا ویروسی(مانند هپاتیت ویروسی یا عفونت سرخجه) تشخیص داده شده در دو گروه تفاوت آماری با یکدیگر نداشتند گرچه در گروه کنترل اندکی بیشتر گزارش شده بود. در بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک، سابقه هپاتیت B، تب روماتیسمی و عفونت هرپس زوستر اندکی بیشتر

گزارش شده بود گرچه از لحاظ آماری بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در نهایت این مطالعه از عامل عفونت (در طی ۱ سال قبل از تشخیص) و واکسیناسیون به عنوان علت یا محرک موثر در ایجاد اسکلروز سیستمیک حمایت نکرد (۱۶).

بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه بین بیماری مورفه آ با عفونت سایتومگالوویروس همراهی وجود ندارد. به دلیل ماهیت گذشته نگر مطالعه، امکان دسترسی به بیماران جهت معاینه آن‌ها از نظر وجود تظاهرات بالینی عفونت با سایتومگالویروس و نیز بررسی سرولوژی آن‌ها وجود نداشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود از روش‌های Insitu PCR و ISH جهت شناسایی محل اصلی وجود CMV در نمونه‌های پوست استفاده گردد. گرچه عمده نمونه‌های مطالعه حاضر (در هر دو گروه مورد و شاهد) با استفاده از روش PCR از نظر CMV مثبت می‌باشند ولی با توجه به اینکه در مطالعاتی که CMV را در پاتوژنز مورفه آ دخیل دانسته‌اند، مکانیسم دخالت سایتومگالوویروس در رخداد مورفه آ، وجود عفونت اولیه یا بازفعال شدن عفونت نهفته CMV در موارد گزارش شده، ذکر شده است و این دو مکانیسم مطرح شده با روش کار مطالعه حاضر قابل بررسی نبودند. بنابراین توصیه می‌شود در مطالعات آتی به صورت آینده نگر همزمان با PCR بر روی نمونه بافت مبتلا به مورفه آ، بررسی سرولوژی تیتر Ig-M و Ig-G اختصاصی ضد CMV و سطوح TNFα و INFγ در سرم بیماران جهت بررسی موارد عفونت اولیه یا فعال شدن مجدد سایتومگالوویروس نهفته انجام شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل تامین هزینه‌های انجام مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

References

1) Kreuter A. Localized scleroderma. Dermatol Ther 2012; 25:135-47.
2) Fett N. Scleroderma: nomenclature, etiology, pathogenesis, prognosis, and treatments: facts and controversies. Clin Dermatol 2013; 31:432-37.
3) Fett N, Werth VP. Update on morphea Part I. Epidemiology, clinical presentation and pathogenesis. J Am Acad Dermatol 2012; 64:217-28.
4) Magro CM, Crowson AN, Ferri C. Cytomegalovirus-associated cutaneous vasculopathy and scleroderma sans inclusion body change. Hum Pathol 2007; 38:42-9.
5) Obtsuka T, Yamazaki S. Prevalence of human cytomegalovirus DNA in scleroderma skin tissue. Int J Dermatol 2006; 45:86-7.
6) Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. Nat Med 2000; 6:1183-6.
7) Sartori-Valinotti JC, Tollefson MM, Reed AM. Updates on morphea: role of vascular injury and advances in treatment. Autoimmune Dis 2013; 2013:467808.
8) Goulabchand R, Khellaf L, Forestier A, Costes V, Foulongne V, le Quellec A. Acute and regressive scleroderma concomitant to an acute CMV primary infection. J Clin Virol 2014; 61:604-7.
9) Wong B, Piliouras P, Mortimore R, Zonta M, Tucker S. Lower limb linear morphoea in a pregnant woman with known Graves' disease and cytomegalovirus immunoglobulin M positivity. Australas J of Dermatol 2015; 56:e96-8.
10) Mostafavi SN, Ataei B, Nokhodian Z, Yaran M, Babak A, Salehi A. Seroprevalence of Cytomegalovirus infection and estimate of congenital Cytomegalovirus infection in Isfahan state, Iran: a population based study. Pak J Med Sci 2013; 29:418-22.
11) Bagheri L, Mokhtarian H, Sarshar N, Ghahramani M. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection during pregnancy in Gonabad, east of Iran: a cross-sectional study. J Res Health Sci 2012; 12:38-44.
12) Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infect Dis 2006; 43:1143-51.
13) Colugnati FA, Staras AS, Dollard SC, Cannon MJ. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. BMC Infect Dis 2007; 7:71.
14) Lwa TR, Lee J, Ng CH, Lew QJ, Hia HC, Chao SH. Human T-lymphotropic virus tax activates human cytomegalovirus major-immediate early promoter and improves production of recombinant proteins in HEK293 cells. Biotechnol Prog 2011; 27:751-6.
15) Bentz GL, Yurochko AD. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:5531-6.

16) Pope JE, Goodwin JL, Ouimet JM, Krizova A, Laskin M. Infections are not increased in scleroderma compared to non-inflammatory musculoskeletal disorders prior to disease onset. Open Rheumatol J 2007; 1:12-7.

Original Article

Evaluation of the association between Morphea and *Cytomegalovirus in a cross sectional study*

Received:22/06/2017 - Accepted: 23/07/2017

Yalda Nahidi[1]
Naser Tayyebi Meibodi[2*]
Zahra Meshkat[3]
Maryam Salehi[4]
Fatemeh Farhangdoost[5]

1- Associate professor of Dermatology, Cutaneous Leishmaniasis Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2- Professor of Pathology, Cutaneous Leishmaniasis Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3- Associate professor of Virology, Virology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4- Associate professor of community medicine, Research center for patient safety, Clinical Research unit, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5- Pathologist,Mashhad,Iran.

* Cutaneous Leishmaniasis Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Tel: 05138022210
Email: tayebin@mums.ac.ir

Abstract

Introduction: Morphea is the most common variety of localized scleroderma, which forms a spectrum of sclerotic diseases that primarily affect the skin. The etiology and pathogenesis of morphea is not yet known; however, a multifactorial process is assumed to trigger an inflammatory and fibrotic cascade. The potential environmental factors involved include Lyme disease, trauma, radiation, drugs, and viral infections such as *Cytomegalovirus* (CMV).
In this study, we sought to assess the relationship between morphea and CMV.

Materials and Methods: Amplification of CMV DNA was detected by PCR on 41 paraffin-embedded tissue sections of morphea patients and 40 healthy skin samples. Data were analyzed by SPSS ver.16 and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Among 41 patients, there were 17 males (17%) and 34 females(83%). Minimum and maximum age of patients was 12 and 72 years, respectively with mean age of 43.5 years. Among 81 beta globin positive samples, CMV DNA was detected in nearly all samples of morphea patients as well as healthy skin samples. Only one sample from case group (2.4%) and two samples from control group (5%) were negative for CMV DNA(P=0.61).
Conclusion: In this study, no significant correlation was found between the amplification of CMV DNA and morphea disease.
Keywords: Morphea disease, CMV, PCR

Acknowledgement: *There is no conflict of interest.*