

## مقاله اصلی

# بررسی ارتباط بین مورفه آ و سیتومگالوویروس در یک مطالعه مقطعی

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

### 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 سیتومگالوویروس اشاره شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین بیماری مورفه آ و سیتومگالوویروس است.

#### روش کار

در این مطالعه مقطعی دو گروهی روی ۴۱ نمونه از بافت پارافینه بیماری مورفه آ تایید شده و ۴۰ نمونه پوست سالم، تکثیر DNA سیتومگالوویروس به وسیله PCR ردیابی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) آنالیز و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### نتایج

از ۸۱ بیمار ۱۳ نفر مذکر (۱۶/۱٪) و ۶۸ نفر مونث (۸۳/۹٪) بودند. کمترین و بیشترین سن بیماران به ترتیب ۱۱ و ۷۲ سال و میانگین سنی ۴۱/۶ سال بود. از بین ۸۱ نمونه بتاگلوبین مثبت، CMV DNA تقریباً 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 ( $p=0/61$ ).

#### نتیجه‌گیری

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

#### کلیدواژه‌ها

بیماری مورفه آ، سیتومگالوویروس، PCR  
پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

یلدا ناهیدی<sup>۱</sup>

ناصر طیبی میبیدی<sup>۲\*</sup>

زهرا مشکات<sup>۳</sup>

مریم صالحی<sup>۴</sup>

فاطمه فرهنگدوست<sup>۵</sup>

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 ویروس‌شناسی، 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

## مقدمه

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

شایع‌ترین زیر گروه اسکلرودرمی موضعی، مورفه آ با بروز آن ۲/۷ تا ۴/۷ در ۱۰۰۰۰ نفر می‌باشد. شیوع بیماری در بزرگسالان و کودکان برابر است و تقریباً 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 نهایتاً افزایش بروز TGF $\beta$  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 بادی‌های ضد CMV در مقایسه با جمعیت عمومی مشاهده شده است (۳).

ماگرو در پژوهش خود بر روی ۷ بیمار با تظاهرات اختلال بافت همبندی شامل ۴ بیمار دارای تظاهرات واسکولیت جلدی و ۳ 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 UL94 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 ایمنولوژیک 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

در این مطالعه مقطعی گذشته نگر با روش نمونه‌گیری غیر احتمالی و مبتنی بر هدف با توجه به نبودن مطالعات قبلی حجم نمونه به صورت پایلوت ۴۱ مورد بیماری مورفه آ و ۴۰ 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 آسیب شناسی با تشخیص بالینی و آسیب شناسی بیماری مورفه آ و معیارهای خروج از مطالعه شامل بیماران با پرونده ناقص، بلوک‌های با میزان بافت ناکافی و نیز نمونه‌هایی

انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر Universal NST به محلول اضافه شد سپس ده بار سر و ته شد. در نهایت مخلوط حاصله مستقیماً 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 ۲۶۰ جفت باز را تکثیر می‌کنند و توالی آن‌ها به شرح زیر می‌باشد:

GH20: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

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

بررسی وجود توالی سیتومگالوویروس در DNA های استخراج شده از بافت‌های پارافینه:

۱۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی تکثیر یافته در ژل آگاروز ۲٪ بدون اضافه کردن بافر، بارگذاری شد و قطعات DNA در ژل آگاروز بر اساس اندازه، وزن و شکل 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 ویور رنگ آمیزی شده و برای ردیابی قطعه CMV با ۲۲۲ جفت باز مورد ارزیابی قرار گرفت.

بعد از انجام PCR بر روی ژن سیتومگالوویروس 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 (نسخه ۱۶) انجام شد.

که PCR ژن بتاگلوبین آن‌ها منفی بود و کیفیت لازم برای انجام PCR نداشتند بود. به عنوان 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 بازمینی قرار گرفت. از بلوک‌های 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 بیمار نیز 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 اپندورف 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 ۱ و ۲ تکرار شد. ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰٪ 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 کاملاً خارج شود (رسوب نباید کاملاً 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 پروتیناز K 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 مجدداً جهت غیر فعال سازی پروتیناز K در ۹۵ درجه سانتی گراد

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 (جدول ۱) (شکل ۲). (p=۰/۶۱)

**جدول ۱.** ارتباط بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس با بیماری مورفه آ در

موارد مثبت برای تکثیر ژن بتاگلوبین

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

از لحاظ تکثیر ژن سایتومگالوویروس از مجموع ۴۱ بلوک مورد ۱۲ نمونه از هر کدام از گروه‌های 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 معنی‌داری 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 در نظر گرفتن گروه‌های 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 سر و گردن، ۸ نمونه از تنه و ۶ نمونه از اندام‌ها دارای تکثیر بودند اما ارتباط معنی‌داری بین

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 فیشر صورت گرفت.

## نتایج

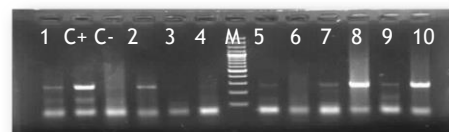
در مطالعه حاضر که به روش گذشته نگر انجام شد از بلوک‌های برداشت پوستی ۶۰ بیمار مبتلا به مورفه آ به عنوان مورد و از نمونه پوستی ۶۰ فرد سالم (که به منظور حذف نووس به درمانگاه پوست مراجعه کرده بودند) به عنوان شاهد استفاده شد. سپس از این تعداد، ۴۱ بلوک مورد و ۴۰ بلوک شاهد مناسب (بر اساس PCR ژن بتاگلوبین)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

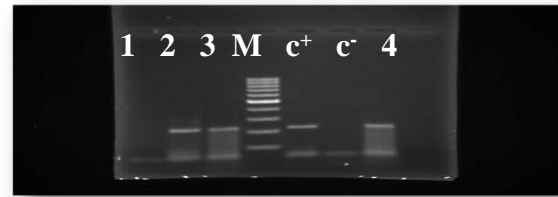
از ۴۱ بیمار مبتلا به مورفه آ، در ۲۴ نفر (۵۸/۵٪) ابتلا غالباً در تنه و در ۱۷ نفر (۴۱/۵٪) در اندام‌ها بود و در سر و گردن درگیری وجود نداشت.

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 (شکل ۱).



**شکل ۱.** نتایج PCR ژن بتاگلوبین، قطعه تکثیر شده یک باند ۲۶۰ جفت بازی است که در نمونه‌های ۱، ۲، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ دارای تکثیر و در ۴، ۵ و ۶ فاقد تکثیر است؛ M؛ سایز مارکر DNA، C<sup>+</sup> کنترل مثبت و C<sup>-</sup> کنترل منفی می‌باشد.

محل درگیری با وجود ژنوم سایتومگالوویروس وجود نداشت ( $p > 0.99$ ).



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 و  $c^-$  کنترل منفی می باشد.

### بحث

در مطالعه حاضر ژنوم سایتومگالوویروس در ۹۷/۶٪ از بیماران مورفه آ و ۹۵٪ گروه شاهد مثبت شد؛ گرچه از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ وجود نداشت ( $p=0.61$ ). 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 شده اند تروما، رادیاسیون، دارو، عفونت ها، خود ایمنی و میکرو کیمریسم می باشند. عوامل عفونی مطرح شده بورلیا بورگدورفری و سایتومگالوویروس می باشند (۳).

سایتومگالوویروس با آلودگی سلول های اندوتلیال به آنها آسیب می رساند؛ علاوه بر آن تکثیر سلول های کشنده طبیعی در پاسخ به عفونت CMV باعث صدمه عروقی و نیز باعث شروع روند فیروز می شود (۸). مکانیسم دیگری که می تواند سبب تحریک سیستم ایمنی علیه سلول های اندوتلیال شود، وجود تشابه مولکولی بین پروتئین UL94 مربوط به ویروس CMV با NAG-2، مولکول سطحی سلول های اندوتلیال و فیروبلاست های درم است که مسئول واکنش متقاطع آنتی بادی های ضد CMV علیه این دو نوع سلول می باشد (۷). عفونت اولیه یا دوباره فعال شدن سایتومگالوویروس به سبب عفونت فیروبلاست ها می تواند پروسه فیروز را فعال کند (۸). در بیماران مبتلا به اسکروز سیستمیک نیز افزایش سطوح آنتی بادی های

ضد CMV در مقایسه با جمعیت عمومی مشاهده می شود اما تاکنون هیچ مطالعه ای CMV را به عنوان یک عامل اتیولوژیک در مورفه آ ارزیابی نکرده است (۳). علیرغم وجود تفاوت در بالین بین مورفه آ و اسکروز سیستمیک این دو بیماری مسیرهای التهابی و ایمنولوژیک مشترکی دارند که در نهایت منجر به آسیب عروقی، افزایش تولید کلاژن و تکثیر ماتریکس خارج سلولی در هر دو وضعیت می شود (۷). ونگ<sup>۱</sup> 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، هیالینزاسیون درم با انفیلترای دور عروقی سطحی و عمقی لنفوسیت همراه با گسترش به چربی زیر جلد و فیروز مشاهده شده است. در نهایت نتیجه گرفت که بیماری مورفه آ ممکن است متعاقب بارداری، بیماری های 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 اسکرودرمی از نظر CMV بررسی شدند. در تمام بیماران Ig-M ضد CMV و یا DNA ویروس در خون محیطی مثبت بود گرچه هیچ انکلوژیون CMV دیده نشد اما در مطالعات هیبریدیژاسیون 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 می تواند باعث ایجاد عفونت و آسیب سلول های اندوتلیال و افزایش ماکروفاژها شود و نهایتاً افزایش بروز  $TGF\beta$  و اختلال تنظیم سیستم ایمنی (افزایش بروز لنفوسیت های B) را سبب گردد که مشابه آن در ضایعات اسکرودرمی هم دیده می شود (۴).

<sup>1</sup> Wong

در مطالعه حاضر ژنوم سایتومگالوویروس در ۹۷/۶٪ از بیماران مورفه آ و ۹۵٪ گروه شاهد مثبت شد؛ گرچه از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین وجود ژنوم سایتومگالوویروس و بیماری مورفه آ وجود نداشت ( $p=0/61$ ).

اما همراهی بالای ژنوم این ویروس در هر دو نمونه مورفه آ و شاهد را به دو صورت می توان 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 در مورد)

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 مطالعه ای که دکتر مصطفوی و همکارانش در اصفهان بر روی نمونه های سرمی انجام دادند شیوع کلی سایتومگالوویروس در همه گروه های سنی را ۹۸/۲٪ گزارش کردند (۱۰).

در پژوهشی که باقری و همکارانش در گناباد انجام دادند ۲۴۰ نمونه سرمی از خانم های 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-G ضد سایتومگالوویروس مثبت بود (۱۱). در مطالعه ای 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. آن ها شیوع عفونت را ۵۸/۹٪ برآورد کردند و نتیجه گرفتند که شیوع عفونت با افزایش سن افزایش می یابد به طوری که طیف وسیعی از ۳/۳٪ 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 لنفوسیت های T، سلول های اندوتلیوم و فیبروبلاست ها شاید علت تعداد زیاد موارد مثبت در این مطالعه، وجود ژن نهفته CMV در ژنوم این سلول ها باشد؛ (۱۴-۱۵) با این حال تاکنون هیچ مطالعه ای در مورد فراوانی وجود ژنوم CMV در نمونه های بافتی پوست در جمعیت ایرانی انجام نشده است. در مطالعه ای Obtsuka در توکیو CMV DNA را با روش PCR در نمونه های پوستی ۴ تا از ۴۸ بیمار با اسکروز سیستمیک و ۵ تا از ۹۷ فرد سالم مثبت بود و تفاوت آماری معنی داری بین دو گروه وجود نداشت بنابراین از فرضیه CMV به عنوان علت اسکروز سیستمیک حمایت نشد که این نتیجه نیز مشابه نتیجه مطالعه حاضر می باشد (۵).

در مطالعه جانت پاپ و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میزان عفونت های باکتریال و ویروسی در اسکرودرمی با سایر اختلالات عضلانی-اسکلتی غیر التهابی مقایسه شد. در این مطالعه ۸۳ بیمار با اسکروز سیستمیک و ۳۵۱ بیمار مبتلا به بیماری های 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 آن ها مشخص شد. نتایج بدست آمده هیچگونه ارتباطی را بین انواع عفونت و اسکروز 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 عفونت ها شامل انواع استرپتوکوکی، اسهال عفونی و عفونت نیازمند مصرف آنتی بیوتیک بود گرچه این تفاوت ها از نظر آماری معنی دار نبود. سابقه هر نوع عفونت باکتریایی (مانند توبرکلوز) و یا ویروسی (مانند هپاتیت ویروسی یا عفونت سرخچه) تشخیص داده شده در دو گروه تفاوت آماری با یکدیگر نداشتند گرچه در گروه کنترل اندکی بیشتر گزارش شده بود. در بیماران مبتلا به اسکروز سیستمیک، سابقه هپاتیت B، تب روماتیسمی و عفونت هرپس زوستر اندکی بیشتر

دخیل دانسته‌اند، مکانیسم دخالت سیتومگالوویروس 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 تیتراژ Ig-M و Ig-G اختصاصی ضد CMV و سطوح TNF $\alpha$  و INF $\gamma$  در سرم بیماران جهت بررسی موارد عفونت اولیه یا فعال شدن مجدد سیتومگالوویروس نهفته انجام شود.

### تشکر و قدردانی

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

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 واکنش‌های سیستمیک به عنوان علت یا محرک موثر در ایجاد اسکروز سیستمیک حمایت نکرد (۱۶). بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه بین بیماری مورفه آ با عفونت سیتومگالوویروس همراهی وجود ندارد. به دلیل ماهیت گذشته نگر مطالعه، امکان دسترسی به بیماران جهت معاینه آن‌ها از نظر وجود تظاهرات بالینی عفونت با سیتومگالوویروس 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

### 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<sup>1</sup>  
 Naser Tayyebi Meibodi<sup>2\*</sup>  
 Zahra Meshkat<sup>3</sup>  
 Maryam Salehi<sup>4</sup>  
 Fatemeh Farhangdoost<sup>5</sup>

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.