ORIGINAL ARTICLE

Investigating the IGSF2 and TNFα Genes Polymorphism and the Risk of Inhibitor Development in Patients with Hemophilia A

Afsaneh Seyed Mikaeili[1],
Azam Bolhassani[2,3],
Nikoo Nasouhi[4]

[1] MSc Student in Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
[3] Associate Professor, Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran

(Received October 3, 2017 ; Accepted January 15, 2018)

Abstract

Background and purpose: Hemophilia is a hereditary X-linked disorder. Females are carriers and males have the disorder. Hemophilia A is caused by deficiency in the production of factor VIII. In some hemophilia patients, inhibitors including IgG1 and IgG4 antibodies are expressed against this factor. These inhibitors interact with factor VIII and suppress its function. The current study aimed at investigating the relationship between single nucleotide IGSF2 and TNFα genes polymorphism and development of inhibitors in patients with hemophilia A.

Materials and methods: In this case-control study, 100 patients with hemophilia A were selected (55 with inhibitor and 45 without inhibitor). Recognition of inhibitor was performed by Bethesda test. DNA was extracted from whole blood samples. A single-nucleotide polymorphism of IGSF2 and TNFα genes was performed using Tetra ARMS-PCR assay.

Results: Hardy-Weinberg equilibrium was investigated in both groups. Comparing the IGSF2 and TNF-α genotypes in these groups indicated a significant correlation between single-nucleotide polymorphism of IGSF2 and development of inhibitors ($p= 0.018$, odds ratios for AA and AG genotypes were 1.39 and 0.37, respectively). A significant association was seen between incidence of inhibitors and consanguineous marriages and viral infection ($p<0.05$). Moreover, the association between response to treatment and Bethesda test was significantly different between the two groups ($p= 0.002$).

Conclusion: According to these results, the risk of development of inhibitors has a direct relationship with mutation in IGSF2 gene.

Keywords: hemophilia A, inhibitor, polymorphism, IGSF2 gene, TNF-α gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (162): 59-68 (Persian).

* **Corresponding Author: Azam Bolhassani -** Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran and Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, Iran (Email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir , azam.bolhassani@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۲ تیر سال ۱۳۹۷ (۶۸-۵۹)

بررسی پلی‌مورفیسم ژن های IGSF2 و TNFα و خطر توسعه مهار کننده در بیماران مبتلا به هموفیلی A

افسانه سید میکائیلی[۱]
اعظم بوالحسنی[۲و۳]
نیکو نصوحی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری هموفیلی بیماری وراثتی وابسته به جنس است که مردها مبتلا و زن‌ها ناقل آن می‌باشند. هموفیلی A ناشی از نقص در تولید فاکتور VIII می باشد. در بعضی از بیماران هموفیلی A مهارکننده‌هایی از نوع آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG4، بیان می‌شود که با فاکتور انعقادی مذکور بر همکنش داشته و مانع از عملکرد آن می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن‌های IGSF2 و TNFα با توسعه مهارکننده‌ها در بیماران هموفیلی نوع A انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ فرد دارای هموفیلی نوع A (۵۵ نفر دارای مهارکننده و ۴۵ نفر بدون مهارکننده) انتخاب شدند و تشخیص مهارکننده، با تست بتسدا انجام شد. از نمونه خون کامل آن‌ها، DNA استخراج گردید و بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن های IGSF2 و TNFα با روش Tetra ARMS-PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: داده‌ها در دو گروه مورد مطالعه از لحاظ تعادل هاردی- واینبرگ بررسی گردید. مقایسه ژنوتیپی ژن‌های IGSF2 و TNFα نشانگر تفاوت معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن IGSF2 و توسعه مهارکننده بوده است (p = ۰/۰۱۸، OR برای ژنوتیپ‌های AA و AG، به ترتیب برابر ۱/۳۹ و ۰/۳۷). به علاوه، ارتباط معناداری بین دو فاکتور ازدواج فامیلی و عفونت ویروسی با مهارکننده مشاهده شد (p < ۰/۰۵). ارتباط بین پاسخ به درمان و آزمون بتسدا نیز تفاوت معنی‌داری نشان داده است (p = ۰/۰۰۲).

استنتاج: با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت که خطر توسعه مهارکننده‌ها با جهش در ژن IGSF2 رابطه مستقیمی دارد.

واژه های کلیدی: هموفیلی A، مهار کننده، پلی‌مورفیسم، ژن IGSF2، ژن TNFα

مقدمه

هموفیلی یک بیماری ارثی می‌باشد که به علت نقص در یکی از ژن‌های فاکتورهای انعقادی‌که روی کروموزوم X وجود دارد، ایجاد می گردد. مردان به این بیماری مبتلا گشته و زنان ناقل بیماری هستند. ۹۰ درصد هموفیلی‌ها جزء هموفیلی A به حساب می‌آیند. هموفیلی A به علت کمبود فاکتور VIII ایجاد می گردد(۱). در حالی که

مولف مسئول- اعظم بوالحسنی: تهران- انستیتو پاستور ایران و مرکز درمان جامع هموفیلی ایران E-mail: A_bolhasani@pasteur.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز درمان جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۷/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

هموفیلی B نادر بوده و به‌علت کمبود فاکتور IX می‌باشد. بیماران هموفیلی شدید در معرض ریسک بالایی از خونریزی‌های خود به خودی، و به طور خاص داخل مفصل‌ها و ماهیچه‌ها هستند که باعث از بین رفتن عملکرد آن‌ها و تغییر شکل در زانو، بازو، و قوزک پای آن‌ها می‌گردد. در موارد شدیدتر بیماران توانایی راه رفتن را از دست می‌دهند و به عمل‌های ارتوپدی و تعویض مفصل نیاز پیدا می‌کنند. خونریزی داخل سیستم عصبی و یا ارگان‌های دیگر می‌تواند کشنده باشد(۲). ژن فاکتور VIII روی کروموزوم Xq28 قرار گرفته است که شامل ۲۶ اگزون بوده و حدود ۲۳۵۱ آمینو اسید را کد می‌کند. پروتئین بالغ دارای ۶ دومین A1-A2-B-A3-C1-C2 می‌باشد. دومین های C2، A2 و A3 مناطقی هستند که آنتی‌بادی‌ها می‌توانند با آن‌ها واکنش نشان دهند و به آبشار انعقاد آسیب برسانند(۳، ۴). مهارکننده‌ها از نوع آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG4 هستند که به دومین‌های عملکردی فاکتورهای VIIIو IX متصل گشته و فعالیت‌های انعقادی آن‌ها را خنثی می‌کنند(۵). بیمارانی که تحت درمان با فاکتورهای انعقادی هستند برای بررسی میزان مهارکننده باید مورد غربالگری قرار گیرند. معمولا تایید حضور مهارکننده و میزان تیتر آن در آزمایشگاه، توسط تست بتسدا مورد بررسی قرار می‌گیرد(۷،۶). ژنتیک و فاکتورهای محیطی در ایجاد این مهارکننده‌ها نقش دارند. فاکتورهای محیطی شامل بیماری‌ها، واکسن‌ها، عفونت‌ها و جراحی‌ها، و فاکتورهای ژنتیکی شامل تاریخچه خانوادگی، جهش‌های ژنتیکی، ژن های پاسخ ایمنی، پلی‌مورفیسم ژن‌های سیتوکین‌ها و نژاد و قومیت می‌باشد(۸). از طرف دیگر پلی‌مورفیسم یا چند شکلی ژن‌های دخیل در التهاب و سیستم ایمنی به عنوان عامل ایجاد مهارکننده در برخی افراد مطرح شده است. برای نمونه، پروتئین IGSF2 که به عنوان CD101 و V7 نیز شناخته می‌شود، یک گلیکوپروتئین عبورکننده از غشاء است که روی مونوسیت، گرانولوسیت، سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T فعال، که شامل سلول‌های عملکردی و سلول‌های T تنظیمی ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) می‌باشند، بیان می‌گردد. سلول‌های T تنظیمی نقش حیاتی در القاء تحمل به فاکتورهای انعقادی و تشکیل مهارکننده در بیماران هموفیلی دارند(۹). به علاوه، فاکتور TNFα باعث ایجاد ترومبوز داخل عروقی، به علت از دست رفتن ویژگی ضد انعقادی نرمال اندوتلیوم می‌شود و TNFα، بیان فاکتور بافتی توسط سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند، هم‌چنین بیان ترومبومدولین (نوعی مهارکننده انعقاد) توسط سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند(۱۰). مهارکننده‌های فاکتور VIII به عنوان مشکلات و عوارض مرتبط با درمان مورد توجه قرار گرفته‌اند. اگر بیمار به درمان پاسخ ندهد به حضور مهارکننده شک می‌شود، به ویژه در مواقعی که بیمار قبلا به درمان پاسخ داده باشد. در این حالت بهبودی قابل انتظار و نیمه عمر فاکتور انعقادی به میزان زیادی کاهش یافته است. مهارکننده‌ها بیش‌تر در افرادی که هموفیلی شدید دارند در مقایسه با افرادی که هموفیلی خفیف و یا متوسط دارند، دیده شده است. در هموفیلی شدید A میانگین زمان توسعه مهارکننده در حدود سه سال یا کم‌تر است و در هموفیلی متوسط یا خفیف نزدیک سی سال است که اغلب متعاقب با جراحی‌ها و گرفتن فاکتور رخ می‌دهد(۱۱، ۱۲). وجود مهارکننده‌ها باعث تشدید بیماری هموفیلی و ایجاد خونریزی‌های شدید شده و در روند درمانی این بیماری اختلال ایجاد می‌کند، علاوه بر این هزینه‌های زیادی را برای بیماران به دنبال خواهد داشت. با توجه به اهمیت مهارکننده‌ها، در این مطالعه، برای اولین بار ارتباط بین پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن‌های IGSF2 و TNFα و خطر توسعه مهارکننده‌ها در بیماران مبتلا به هموفیلی A در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، با توجه به تعداد افراد مراجعه‌کننده به مرکز درمان جامع هموفیلی ایران و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

فراوانی متغیرهای موردنظر با استفاده از مطالعات گذشته و نیز معیارهای مورد نظر برای ورود افراد به مطالعه مانند داشتن یا نداشتن تاریخچه خانوادگی و ابتلا به عفونت و با در نظر گرفتن خطای ۰/۰۵، تعداد حجم نمونه ۱۰۰ نفر تعیین گردید که از بین این ۱۰۰ نفر، ۵۵ نفر از آن‌ها دارای مهار کننده و ۴۵ نفر از آن‌ها بدون مهارکننده بودند. پس از اخذ کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.139567، از هر یک از افراد مورد مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه گرفته شد. نمونه خون وریدی بیماران با نسبت ۹ به ۱ با سیترات سدیم (ماده ضد انعقاد خون) ۳/۲ گرم بر دسی لیتر به خوبی مخلوط گردید. برای جدا کردن پلاسما، نمونه‌ها با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند.

تشخیص مهارکننده‌های فاکتور VIII در بیماران هموفیلی A

به منظور تعیین وجود یا عدم وجود مهار کننده (آنتی‌بادی) فاکتور انعقادی و اندازه‌گیری سطح آن در بدن بیمار، از روش بتسدا استفاده شد. اساس بتسدا مخلوط‌سازی پلاسمای نرمال و پلاسمای بیمار و ارزیابی فاکتور می‌باشد. واحد بتسدا میزانی از مهارکننده است که برای غیر فعال کردن ۵۰ درصد از فاکتور VIII در پلاسمای نرمال نیاز است(۱۳). برای اندازه‌گیری مهارکننده فاکتور VIII از روش Nijmegen استفاده شد که در آن از آلبومین گاوی (جهت حفظ پروتئین‌ها) و بافر ایمیدازول و پلاسمای نرمال استفاده گردید(۱۴). در نهایت پس از ۲ ساعت انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه، با استفاده از کیت BIOPHEN، به کمک دستگاه Coagulation، منحنی مربوطه رسم و سپس نمونه‌ها داخل دستگاه قرار داده شد تا میزان دقیق فاکتور مربوطه اندازه‌گیری شود.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر، از کیت استخراج ژنومی GF-1 استفاده شد و به ۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه خون، بافرهای مورد نظر جهت لیز سلولی اضافه گردید. هم‌چنین آنزیم پروتئیناز K جهت از بین بردن پروتئین‌ها استفاده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. از ستون‌های کیت که دارای خاصیت کروماتوگرافی تعویض یونی هستند جهت انجام تخلیص استفاده شد. در نهایت DNA ژنومی در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر، حل گردید و غلظت و خلوص DNA ژنومی توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد.

طراحی پرایمر

به منظور انجام آزمایش Tetra ARMS-PCR، ابتدا پرایمرهای مربوط به ژن‌های مورد نظر را با پایگاه اطلاعاتی primer1، طراحی کرده، و سپس با استفاده از پایگاه‌های Primer BLAST NCBI و Oligo analyzer و به کمک نرم‌افزار Snap gene توالی پرایمرها بررسی شد.

بررسی پلی‌مورفیسم های مرتبط با مهار کننده

جهت بررسی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) احتمالی در ژن‌های مورد نظر، واکنش Tetra ARMS-PCR صورت گرفت تا علاوه بر تعیین وجود پلی‌مورفیسم، جایگاه آن نیز مشخص شود. یک جفت پرایمر (آغازگر رو به جلو بیرونی و معکوس داخلی) باعث تکثیر قطعه‌ای می‌شود که حاوی آلل G است و جفت دیگر پرایمر (آغازگر رو به جلو داخلی و معکوس بیرونی) باعث تکثیر قطعه‌ای می‌شود که حاوی آلل A است. پرایمرهای بیرونی برای حالت‌های هموزیگوت و هتروزیگوت یک قطعه یکسان می دهد و این قطعه به عنوان کنترل برای تمام نمونه‌ها به کار می‌رود(۱۵). این روش با استفاده از چهار پرایمر (۲ پرایمر کنترل و ۲ پرایمر برای هر دو نوع ژنوتایپ) انجام شد و در یک مرحله تعیین ژنوتایپ گردید. در جدول شماره ۱ و ۲ مشخصات پرایمرهای ژن‌های IGSF2 و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

TNFα به ترتیب آورده شده است. حجم کلی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر و متشکل از ۱۰ میکرو لیتر (Tris-Hcl ،MgCl2 ،dNTP ،Taq DNA Polymerase) Master mix 2X، ۰/۵ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکو مول همراه با ۷ میکرو لیتر آب، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم بوده است. شرایط واکنش Tetra ARMS-PCR شامل مراحل دناتوره شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای $94^{\circ}C$، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای $65^{\circ}C$ و طویل سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای $72^{\circ}C$ (۳۵ سیکل) برای دستگاه ترموسایکلر مدل Peltier تنظیم شد. برای بررسی صحت نتایج واکنش Tetra ARMS-PCR از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. به علاوه، جهت تایید واکنش Tetra ARMS-PCR، نمونه‌های هتروزیگوت و هموزیگوت گروه‌های مهارکننده و بدون مهارکننده به روش سنگر توالی یابی شد و نتایج توالی‌یابی از نظر وجود پلی‌مورفیسم موردنظر با برنامه Snap gene و Blast بررسی گردید.

جدول‌شماره۱: پرایمرهای طراحی‌شده ومشخصات آن‌ها برای ژنTNFα

IGSF2 (rs2296449)	توالی پرایمر	اندازه محصول(bp)	دمای ذوب °C
Forward inner primer (G allele)	AGCTGATTGCTCAAGTTGGTTAAATGTATG	۲۱۳	۶۸
Reverse inner primer (A allele)	AGACAGGGAGGGTCTCCTGGGAACGT	۳۵۸	۷۰
Forward outer primer (5' - 3')	AAAGTGACAGGAGGGTTTTATGGGGTGA	۵۱۵	۶۹
Reverse outer primer (5' - 3')	AGAGAATCTTGGATGGACTCTGCTGCAG		۶۹

جدول شماره ۲: پرایمرهای طراحی شده ومشخصات آن‌ها برای ژنTNFα

TNFα (rs1800629)	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای ذوب °C
Forward inner primer (G allele)	GGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCAGGG	۲۰۹	۷۴
Reverse inner primer (A allele)	GTAGGACCCTGGAGGCTGAACCCCGTACT	۳۵۲	۷۴
Forward outer primer (5' - 3')	GTCTGTGAATTCCCGGGGGTGATTTCACT	۵۰۵	۷۴
Reverse outer primer (5' - 3')	GGCCCTGCACCTTCTGTCTCGGTTTCTT		۷۴

ارتباط مهارکننده ها با داده های درمانی

ارتباط بین ازدواج فامیلی و عفونت با ویروس هپاتیت C با میزان مهار کننده، علاوه بر ارتباط بین پاسخ به درمان و میزان واحد بتسدا از نظر آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ استفاده شد. برای بررسی فراوانی هر آلل و ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن‌های IGSF2 و TNFα در دو گروه از آزمون‌های Chisquare و Logistic regression و بررسی ارتباط بین میزان تست بتسدا و پاسخ به درمان توسط آزمون Mann-Whitney استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده گردید و برای تمامی آنالیزها، ارزش $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعیین مهارکننده‌های فاکتور VIII توسط تست بتسدا

در این روش به منظور تهیه و جداسازی پلاسما، نمونه‌ها با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه برای جدا کردن پلاسما سانتریفوژ شدند. رقت‌های مناسب تهیه شد و میزان مهارکننده توسط دستگاه Coagulation محاسبه گردید. بعد از آماده شدن دستگاه و کشیدن نمودار مربوط و اطمینان از عملکرد آن، نمونه‌ها در دستگاه قرار داده و آسپیره شدند. نسبت خوانده شده نمونه کنترل/ نمونه بیمار در محدوده ۲۵ تا ۷۵ درصد، محدوده قابل قبول برای اندازه‌گیری مهارکننده در نظرگرفته شد.

نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های IGSF2 و TNFα توسط واکنش Tetra-primer ARMS-PCR روی ژل آگارز

پس از استخراج DNA ژنومی، غلظت DNA ها و هم‌چنین خلوص آن‌ها توسط نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ تعیین شد. تمامی نمونه‌ها غلظت مناسبی داشتند (حدود ۴۰۰-۳۰۰ نانو گرم/میکرو لیتر) و نسبت جذب در محدوده ۲-۱/۸ بوده است که نشانگر خلوص نمونه‌های مورد مطالعه است. البته نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۳۰ نیز بررسی شد که بیش‌تر از ۲ بوده است. به منظور بررسی صحت نتایج واکنش Tetra ARMS-PCR برای ژن های IGSF2 و TNFα از روش الکتروفورز با ژل آگارز دو درصد استفاده شد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

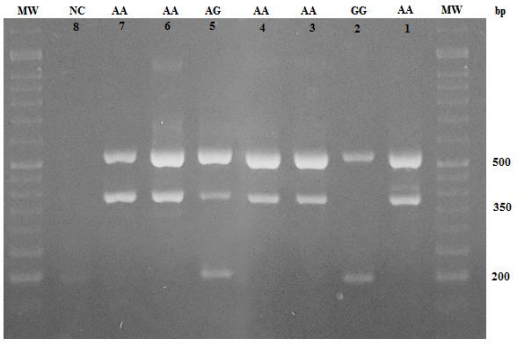
که در تصویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج PCR برای ژن IGSF2، باندهایی با اندازه‌های ۳۵۸ جفت باز برای آلل A، ۲۱۳ جفت باز برای آلل G و باند کنترل ۵۱۵ جفت باز را نشان داد. به علاوه، نتایج PCR برای ژن TNFα، باندهایی با اندازه‌های ۳۵۲ جفت باز برای آلل A، ۲۰۹ جفت باز برای آلل G و باند کنترل ۵۰۵ جفت باز را نشان داده است.

نتایج فراوانی ژن های IGSF2 و TNFα

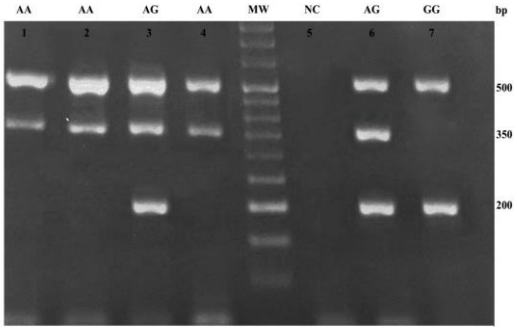
در ابتدا بررسی فراوانی ژنوتیپ های ژن های IGSF2 و TNFα توسط تعادل هاردی- واینبرگ انجام شد و صحت آن‌ها مورد تایید قرار گرفت. سپس، فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن‌های مذکور مورد آنالیز قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ‌های ژن‌های IGSF2 و TNFα و نیز آلل‌ها در دو گروه دارای مهار کننده و بدون مهارکننده در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه در ارتباط با ژن IGSF2 وجود دارد ($p < ۰/۰۵$) ولی در ارتباط با ژن TNF-α تفاوتی مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$).

آنالیز سایر داده های درمانی

بررسی ارتباط بین ازدواج فامیلی و میزان مهارکننده در افراد مورد مطالعه معنی‌دار بوده است ($p = ۰/۰۲۶$). آنالیز آماری بین عفونت با ویروس هپاتیت C و میزان



تصویر شماره ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن IGSF2: ستون‌های ۴-۱(نمونه‌های دارای مهار کننده). ستون های ۷-۵ (نمونه‌های بدون مهار کننده). ستون۸ مربوط به نمونه کنترل منفی (NC) می باشند. اندازه محصول برای آلل A، ۳۵۸ جفت باز و برای آلل G ۲۱۳ جفت باز و باند کنترل ۵۱۵ جفت باز. MW مارکر وزن مولکولی می باشد (۵۰ جفت باز، فرمنتاز). ژل الکتروفورز ۲ درصد می باشد



تصویر شماره ۲: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن TNFα: ستون‌های ۴-۱ (نمونه های دارای مهارکننده). ستون های ۶ و ۷ (نمونه‌های بدون مهارکننده). ستون ۵ مربوط به نمونه کنترل منفی (NC) می باشد. اندازه محصول برای آلل A، ۳۵۲ جفت باز و برای آلل G، ۲۰۹ جفت باز و باند کنترل ۵۰۵ جفت باز. MW مارکر وزن مولکولی می باشد (۵۰ جفت باز، فرمنتاز). ژل الکتروفورز ۲ درصد می باشد.

جدول شماره ۳: توزیع ژنوتیپ و فراوانی آلل های پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن های IGSF2 و TNFα در دو گروه

ژنوتیپ و آلل	تعداد کل	تعداد بیمار با مهار کننده (درصد)	تعداد بیمار بدون مهار کننده (درصد)	p value Genotype	p value Allele	Odd ratio, 95% CI* (Lower-Upper, P value)
IGSF2	۱۰۰	۵۵	۴۵	۰/۰۱۸	۰/۱۷۴	
AA	۴۳	۱۸ (۳۲/۷)	۲۵ (۵۵/۶)			۱/۳۸۹ (۰/۴-۴۷۹/۰۳۱، ۰/۵۴۶)
AG	۳۷	۲۷ (۴۹/۱)	۱۰ (۲۲/۲)			۰/۳۷۰ (۰/۱-۱۱۹/۱۵۶، ۰/۰۸۷)
GG	۲۰	۱۰ (۱۸/۲)	۱۰ (۲۲/۲)			گروه رفرنس
A	۱۲۳	۶۳ (۵۷/۳)	۶۰ (۶۶/۷)			۱/۴۹ (۰/۲-۸۳۷/۶۶، ۰/۱۷۵)
G	۷۷	۴۷ (۴۲/۷)	۳۰ (۳۳/۳)			گروه رفرنس
TNFα	۱۰۰	۵۵	۴۵	۰/۸۷۳	۰/۴۳۱	
AA	۸۰	۴۵ (۸۱/۸)	۳۵ (۷۷/۸)			۰/۶۲۲ (۰/۲-۱۵۵/۴۹۱، ۰/۵۰۳)
AG	۱۱	۶ (۱۰/۹)	۵ (۱۱/۱)			۰/۶۶۷ (۰/۳-۱۱۳/۹۱۹، ۰/۶۵۴)
GG	۹	۴ (۷/۳)	۵ (۱۱/۱)			گروه رفرنس
A	۱۷۱	۹۶ (۸۷/۳)	۷۵ (۸۳/۳)			۰/۷۲۹ (۰/۱-۳۳۱/۶۰۴، ۰/۴۳۲)
G	۲۹	۱۴ (۱۲/۷)	۱۵ (۱۶/۷)			گروه رفرنس

* CI: confidence interval

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

مهارکننده در دو گروه ارتباط معنی‌داری را نشان داد (p = ۰/۰۰۶). در جدول شماره ۴ این بررسی‌ها نشان داده شده است. ارتباط بین پاسخ به درمان و میزان واحد بتسدا در گروه مهارکننده، با آزمون ناپارامتری من ویتنی مورد بررسی قرار گرفت میانگین امتیاز بتسدا و پاسخ به درمان ۱۸/۵۳ و میانگین امتیاز بتسدا و عدم پاسخ به درمان ۳۲/۶۱ بوده است که بین این دو عامل، ارتباط معنی‌داری وجود داشت (p = ۰/۰۰۲).

جدول شماره۴: مقایسه داده‌های درمانی در دوگروه دارای مهارکننده و بدون مهار کننده

پارامتر	گروه مهار کننده (۵۵ نفر)			گروه بدون مهار کننده (۴۵ نفر)			سطح معنی داری
ازدواج فامیلی	بله		خیر	بله		خیر	۰/۰۲۶
تعداد (نفر)	۲۸		۲۷	۱۳		۳۲	
عفونت ویروسی	آلوده	مشکوک	سالم	آلوده	مشکوک	سالم	۰/۰۰۶
تعداد (نفر)	۲۳	۱۶	۱۶	۱۸	۳	۲۴	

بحث

این مطالعه، برای اولین بار بر روی ژنوتیپ‌های ژن‌های IGSF2 و TNFα و بررسی میزان مهارکننده در بیماران با هموفیلی A در ایران، انجام گرفته است. با مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در دو گروه دارای مهارکننده و بدون مهارکننده با توجه به p = ۰/۰۱۸ اختلاف معنی‌داری در ژن IGSF2 به دست آمد. در آنالیز ژن TNFα تفاوت معنی‌داری در مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در دو گروه مشاهده نگردید (p> ۰/۰۵). در بررسی میزان ریسک خطر (OR) ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در مقایسه با ژنوتیپ و آلل گروه رفرنس، هیچ برتری برای این ژنوتیپ‌ها نسبت به یکدیگر در دو گروه مورد مطالعه با توجه به p>۰/۰۵ به دست نیامد. با توجه به مطالعات بالینی، در درمان بیمارانی که مهارکننده دارند دو هدف، یکی کنترل خونریزی‌های حاد شدید و دیگری ایجاد تحمل ایمنی یا حداقل تبدیل کردن یک پاسخ‌دهنده قوی به یک پاسخ‌دهنده ضعیف با از بین بردن آنتی‌بادی ها، وجود دارد. هدف اصلی در درمان خونریزی‌های حاد، رسیدن به سطح قابل ملاحظه‌ای از فاکتور VIII در جریان خون می باشد که غلظت آنتی‌بادی بیمار عامل مهمی در این خصوص می‌باشد. بیمارانی که دارای مهارکننده با پاسخ پایین به درمان هستند باید با تیتر بالای فاکتور انعقادی درمان شوند تا فعالیت مهارکننده خنثی و خونریزی درمان شود. در بیمارانی که واکنش ایمنی شدید دارند هنگامی‌که تیتر آنتی‌بادی پایین (کم‌تر از ۵ واحد بتسدا) است، می‌توان یک ماده سیتوتوکسیک مانند سیکلوفسفامید به همراه دوز های بالای فاکتور تزریق نمود و گاهی نیز از کنسانتره کمپلکس پروترومبین فعال و یا فاکتور هفت نوترکیب استفاده کرد. کارایی دو دوز فاکتور هفت نوترکیب و یک دوز پروترومبین فعال شده با هم برابر است که برای درمان بیماران با مهارکننده استفاده می‌شود(۱۶). در بیماران با هموفیلی شدید A برای از بین بردن مهارکننده از روش القاء تحمل ایمنی استفاده می‌شود(۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Ding و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین انجام گرفت، سلول‌های T تنظیمی $CD4^+CD25^+$ و سطح سلول‌های مونونوکلئور خون محیطی و فاکتور رونویسی $Foxp3^+$ با فلوسایتومتری اندازه گرفته شد و سهم $CD4^+CD25^+$ در بیماران با مهار کننده بیش‌تر بوده است(۱۸).

در مطالعه ای که توسط El-Asrar و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مصر انجام شد، ۴۵ کودک دارای هموفیلی A و ۴۵ کودک بدون هموفیلی A مورد مطالعه قرار گرفت و توسط فلوسایتومتری میزان سلول‌های تنظیمی $CD4^+CD25^+$ اندازه گرفته شد. میزان این سلول‌ها در بیماران هموفیلی دارای مهارکننده در مقایسه با بیماران هموفیلی بدون مهارکننده و بیماران سالم کاهش چشمگیری را نشان داد(۱۹). در مطالعه متا آنالیز انجام گرفته توسط Astermark و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی بیماران هموفیلی، با توجه به نتایج حاصل، ۵۵ درصد بیماران یا دارای مهارکننده بودند یا زمینه خانوادگی داشتند. نتایج این تحقیق اختلاف معنی‌داری را در ژنوتیپ ژن IGSF2 در دو گروه دارای مهار کننده و بدون مهارکننده نشان

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

داد(۲۰). در مطالعه‌ای که توسط Walsh و همکاران در سال ۲۰۱۵ در آمریکا صورت گرفت، اطلاعات مربوط به ۷۳۸۶ مرد با هموفیلی شدید A در طول ۱۳ سال مطالعه شد تا پی به ارتباط بین تشکیل مهار کننده و میزان مرگ و میر ببرند. علائم بالینی که باعث مرگ و میر شده بود شامل: افزایش خونریزی‌ها، علائم بیماری‌های کبدی، آلودگی با HCV یا HIV و حضور مهارکننده بود و هم‌چنین میزان مرگ و میر در بیماران با مهارکننده ۷۰ درصد بیش‌تر از بیماران بدون مهارکننده بوده است(۲۱). مطالعات نشان داده است که خطر توسعه مهارکننده در بیماران با تاریخچه خانوادگی بیش‌تر از سایرین می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Astermark و همکاران در سال ۲۰۰۵ در سوئد انجام شد، ۷۲ درصد افراد دارای مهارکننده، تاریخچه خانوادگی داشته‌اند(۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Chaves و همکاران در سال ۲۰۱۰ در برزیل صورت گرفت ارتباط پلی‌مورفیسم با توسعه مهارکننده در IL-10، IL-5، IL-4 و TNFα (A-308G)، بررسی شد. میزان مهار کننده توسط روش نایمگن اندازه گرفته شد. نتیجه بررسی ژنوتیپ هیچ ارتباطی را بین توسعه مهار کننده و ژنوتیپ TNFα، IL-5، IL-4، نشان نداده است(۲۳). در مطالعه‌ای که توسط Pergantou و همکاران در یونان در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت ارتباط بین جهش وارونگی اینترون ۲۲ ژن فاکتور VIII، آلل و هاپلوتایپ‌های HLA و پلی‌مورفیسم سایتوکاین‌های خاص از جمله TNFα، با خطر توسعه مهارکننده در ۵۲ کودک مبتلا به هموفیلی شدید A که با فاکتورهای نوترکیب درمان شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری در مورد پلی‌مورفیسم ژن TNFα (A-308G) در مقایسه دو گروه دارای مهارکننده و بدون مهارکننده مشاهده نشد(۲۴). با توجه به این که ژن IGSF2 روی سلول‌های T تنظیمی بیان می‌گردد می‌توان گفت مطالعه حاضر، موافق با مطالعه Ding (۱۸) و Astermark (۲۰) و در تقابل با مطالعه El-Asrar (۱۹) بوده است. با توجه به مطالعات پیشین در مورد پلی‌مورفیسم ژن TNFα، این مطالعه در راستای تحقیقات Chaves (۲۳) و Pergantou (۲۴) قرارگرفت. در مطالعه حاضر داشتن سابقه خانوادگی و آلودگی HCV به عنوان فاکتور خطر در بیماران با مهارکننده گزارش گردید که یافته‌های Walsh (۲۱) و Astermark (۲۲) را تایید کرده است. با توجه به بازه زمانی، استراتژی‌های درمانی، تعداد مراکز آزمایشگاهی محدود برای بررسی بیماران هموفیلی دارای مهارکننده و پایش میزان فاکتور و تغییر آن با گذشت زمان و نیز امکان ایجاد جهش‌های ناشناخته جدید و احتمال تاثیر سایر ژن‌ها و سیتوکین‌های سیستم ایمنی و عوامل غیر ژنتیکی که در ایجاد مهارکننده می‌توانند نقش داشته باشند، هم‌چنین بار سنگین هزینه‌های درمانی برای بیماران، این مطالعه به پژوهش‌های گسترده‌تری نیازمند می‌باشد. در حقیقت، با توجه به اهمیت موضوع مهار کننده ها و فقدان اطلاعات کافی در ارتباط با تأثیر عوامل ژنتیکی در بیماران هموفیل ایرانی بایستی تحقیقات گسترده‌تری روی تعداد نمونه‌های بیش‌تر افراد مبتلا به هموفیلی با همکاری مراکز دیگر صورت گیرد که یکی از محدودیت‌ها در اکثر پروژه‌های تحقیقاتی است. به طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم ژن IGSF2 با خطر توسعه مهارکننده در بیماران هموفیلی وجود دارد. هم‌چنین داشتن سابقه خانوادگی و آلودگی با HCV، به عنوان فاکتور خطر در بیماران با مهار کننده قابل اهمیت است.

سپاسگزاری

محققین این مطالعه بر خود لازم می‌دانند که از تمامی افراد شرکت‌کننده در مطالعه و مرکز درمان جامع هموفیلی ایران به خاطر مشارکت و همکاری صمیمانه ایشان در این تحقیق و هم‌چنین کمک‌های تکنیکی خانم نیلوفر نادری، دکتر علی نامور، دکتر مژگان میرآخورلی، دکتر محمد جاذبی، دکتر علیرضا عزیزی و خانم سمیه معززی تشکر و قدردانی نمایند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

References

1. AlFadhli S, Nizam R. Violating the Theory of Single Gene-Single Disorder: Inhibitor Development in Hemophilia. Indian J Hematol Blood Transfusion 2015; 31(2): 162-168.
2. Stonebraker J, Bolton Maggs P, Michael Soucie J, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. Haemophilia 2010; 16(1): 20-32.
3. Shen BW, Spiegel PC, Chang C-H, Huh J-W, Lee J-S, Kim J, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. Blood 2008; 111(3): 1240-1247.
4. Swystun LL, James PD. Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. Blood Rev 2017; 31(1): 47-56.
5. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. Blood 2015; 125(13): 2045-2051.
6. Meijer P, Verbruggen B .The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. Semin Thromb Hemost 2009; 35(8): 786-793.
7. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA, editors. Improvements in factor VIII inhibitor detection: from Bethesda to Nijmegen. Semin Thromb Hemost 2009; 35(8):752-759.
8. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. Haemophilia 2006; 12(s6): 15-22.
9. Kamate C, Lenting P, Van Den Berg H, Mutis T. Depletion of CD4+/CD25high regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII specific T cell responses in healthy individuals. J Thromb Haemost 2007; 5(3): 611-613.
10. Wu H, Hymowitz SG. Structure and function of tumor necrosis factor (TNF) at the cell surface. In: Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis, editors, Handbook of Cell Signaling. 2th ed. New Yourk: Oxford; 2009. p. 265-275.
11. Kempton C, Soucie J, Miller C, Hooper C, Escobar M, Cohen A, et al. In non severe hemophilia A the risk of inhibitor after intensive factor treatment is greater in older patients: a case–control study. J Thromb Haemost 2010; 8(10): 2224-2231.
12. Eckhardt C, Menke L, Van Ommen C, Van Der Lee J, Geskus R, Kamphuisen P, et al. Intensive peri operative use of factor VIII and the Arg593 Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. J Thromb Haemost 2009; 7(6): 930-937.
13. Kasper CK. Diagnosis and management of inhibitors to factors VIII and IX: An Introductory Discussion for Physicians. Treatment of Hemophilia Monograph Series, No. 34. World Federation of Hemophilia, Montreal, Québec, Canada; 2004
14. Duncan E, Collecutt M, Street A. Nijmegen-Bethesda assay to measure factor VIII inhibitors. Haemostasis: Methods and Protocols 2013; 992: 321-333.
15. Medrano RFV, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. Mol Biotechnol 2014; 56(7): 599-608.
16. Astermark J, Donfield SM, DiMichele DM, Gringeri A, Gilbert SA, Waters J, et al. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. Blood 2007; 109(2): 546-551.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

17. Coppola A, Di Minno MN, Santagostino E. Optimizing management of immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A and inhibitors: towards evidence based approaches. Br J Hematol 2010; 150(5): 515-528.
18. Ding K, Ji W, Wu J, Li T, Sheng Y. Higher frequency of CD4 (+) CD25 (high) Treg cells in hemophilia patients with factor VIII inhibitor. Genet Mol Res 2014; 13: 1774-1781.
19. El-Asrar MA, Hamed AE-S, Darwish YW, Ismail EAR, Ismail NA. Assessment of the frequency of regulatory T cells (CD4+ CD25+ CD127−) in children with hemophilia A: relation to factor VIII inhibitors and disease severity. Blood Coagul Fibrinolysis 2016; 27(1): 42-46.
20. Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, Schwarz J, Menius ED, Pavlova A, et al. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. Blood 2013; 121(8): 1446-1454.
21. Walsh CE, Soucie JM, Miller CH. Impact of inhibitors on hemophilia A mortality in the United States. Am J Hematol 2015; 90(5): 400-405.
22. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Berntorp E, group MIBSs. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. Haematologica 2005; 90(7): 924-931.
23. Chaves D, Belisário A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. Int J Immunogenet 2010; 37(2): 79-82.
24. Pergantou H, Varela I, Moraloglou O, Economou M, Spanou K, Kapsimali Z, et al. Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A. Haemophilia 2013; 19(5): 706-710.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]