

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

Afsaneh Seyed Mikaeili¹,
Azam Bolhassani^{2,3},
Nikoo Nasouhi⁴

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 TNF α 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 TNF α 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)

بررسی پلی مورفیسم ژن های IGSF2 و TNF α و خطر توسعه مهار کننده در بیماران مبتلا به هموفیلی A

افسانه سید میکائیلی^۱اعظم بوالحسنی^{۳و۲}نیکو نصوحی^۴

چکیده

سابقه و هدف: بیماری هموفیلی بیماری وراثتی وابسته به جنس است که مردها مبتلا و زن ها ناقل آن می باشند. هموفیلی A ناشی از نقص در تولید فاکتور VIII می باشد. در بعضی از بیماران هموفیلی A مهار کننده هایی از نوع آنتی بادی های IgG1 و IgG4، بیان می شود که با فاکتور انعقادی مذکور بر همکنش داشته و مانع از عملکرد آن می شوند. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن های IGSF2 و TNF α با توسعه مهار کننده ها در بیماران هموفیلی نوع A انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ فرد دارای هموفیلی نوع A (۵۵ نفر دارای مهار کننده و ۴۵ نفر بدون مهار کننده) انتخاب شدند و تشخیص مهار کننده، با تست بتسدا انجام شد. از نمونه خون کامل آن ها، DNA استخراج گردید و بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن های IGSF2 و TNF α با روش Tetra ARMS-PCR انجام گرفت.

یافته ها: داده ها در دو گروه مورد مطالعه از لحاظ تعادل هاردی-واینبرگ بررسی گردید. مقایسه ژنوتیپی ژن های IGSF2 و TNF α نشانگر تفاوت معنی دار بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن IGSF2 و توسعه مهار کننده بوده است (OR = ۰/۱۸، p = ۰/۰۱۸) برای ژنوتیپ های AA و AG، به ترتیب برابر ۱/۳۹ و ۰/۳۷). به علاوه، ارتباط معناداری بین دو فاکتور ازدواج فامیلی و عفونت ویروسی با مهار کننده مشاهده شد (p < ۰/۰۵). ارتباط بین پاسخ به درمان و آزمون بتسدا نیز تفاوت معنی داری نشان داده است (p = ۰/۰۰۲).

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

واژه های کلیدی: هموفیلی A، مهار کننده، پلی مورفیسم، ژن IGSF2، ژن TNF α

مقدمه

بیماری مبتلا گشته و زنان ناقل بیماری هستند. ۹۰ درصد هموفیلی ها جزء هموفیلی A به حساب می آیند. هموفیلی A به علت کمبود فاکتور VIII ایجاد می گردد (۱). در حالی که

هموفیلی یک بیماری ارثی می باشد که به علت نقص در یکی از ژن های فاکتورهای انعقادی که روی کروموزوم X وجود دارد، ایجاد می گردد. مردان به این

E-mail: A_bolhasani@pasteur.ac.ir

مؤلف مسئول - اعظم بوالحسنی: تهران - انستیتو پاستور ایران و مرکز درمان جامع هموفیلی ایران

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، بخش هیپاتیت 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

هموفیلی B نادر بوده و به علت کمبود فاکتور IX می باشد. بیماران هموفیلی شدید در معرض ریسک بالایی از خونریزی های خود به خودی، و به طور خاص داخل مفصل ها و ماهیچه ها هستند که باعث از بین رفتن عملکرد آنها و تغییر شکل در زانو، بازو، و قوزک پای آنها می گردد. در موارد شدیدتر بیماران توانایی راه رفتن را از دست می دهند و به عمل های ارتوپدی و تعویض مفصل نیاز پیدا می کنند. خونریزی داخل سیستم عصبی و یا ارگان های دیگر می تواند کشنده باشد (۲). ژن فاکتور VIII روی کروموزوم Xq28 قرار گرفته است که شامل ۲۶ اگرون بوده و حدود ۲۳۵۱ آمینو اسید را کد می کند. پروتئین بالغ دارای ۶ دومین A1-A2-B-A3-C1-C2 می باشد. دومین های A2، C2 و A3 مناطقی هستند که آنتی بادی ها می توانند با آنها واکنش نشان دهند و به آبشار انعقاد آسیب برسانند (۳، ۴). مهارکننده ها از نوع آنتی بادی های IgG1 و IgG4 هستند که به دومین های عملکردی فاکتورهای VIII و IX متصل گشته و فعالیت های انعقادی آنها را خنثی می کنند (۵). بیمارانی که تحت درمان با فاکتورهای انعقادی هستند برای بررسی میزان مهارکننده باید مورد غربالگری قرار گیرند. معمولاً تایید حضور مهارکننده و میزان تتر آن در آزمایشگاه، توسط تست بتسدا مورد بررسی قرار می گیرد (۶، ۷). ژنتیک و فاکتورهای محیطی در ایجاد این مهارکننده ها نقش دارند. فاکتورهای محیطی شامل بیماری ها، واکنش ها، عفونت ها و جراحی ها، و فاکتورهای ژنتیکی شامل تاریخچه خانوادگی، جهش های ژنتیکی، ژن های پاسخ ایمنی، پلی مورفیسم ژن های سیتوکین ها و نژاد و قومیت می باشد (۸). از طرف دیگر پلی مورفیسم یا چند شکلی ژن های 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 می شود، یک گلیکوپروتئین عبورکننده از غشاء است که روی مونوسیت، گرانولوسیت، سلول های دندریتیک و سلول های T فعال، که شامل سلول های

عملکردی و سلول های T تنظیمی ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) می باشند، بیان می گردد. سلول های T تنظیمی نقش حیاتی در القاء تحمل به فاکتورهای انعقادی و تشکیل مهارکننده در بیماران هموفیلی دارند (۹). به علاوه، فاکتور $TNF\alpha$ باعث ایجاد ترومبوز داخل عروقی، به علت از دست رفتن ویژگی ضد انعقادی نرمال اندوتلیوم می شود و $TNF\alpha$ ، بیان فاکتور بافتی توسط سلول های اندوتلیال را تحریک می کند، هم چنین بیان ترومبومدولین (نوعی مهارکننده انعقاد) توسط سلول های اندوتلیال را مهار می کند (۱۰). مهارکننده های فاکتور VIII به عنوان مشکلات و عوارض مرتبط با درمان مورد توجه قرار گرفته اند. اگر بیمار به درمان پاسخ ندهد به حضور مهارکننده شک می شود، به ویژه در مواقعی که بیمار قبلاً به درمان پاسخ داده باشد. در این حالت بهبودی قابل انتظار و نیمه عمر فاکتور انعقادی به میزان زیادی کاهش یافته است. مهارکننده ها بیش تر 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 کم تر است و در هموفیلی متوسط یا خفیف نزدیک سی سال است که اغلب متعاقب با جراحی ها و گرفتن فاکتور رخ می دهد (۱۱، ۱۲). وجود مهارکننده ها باعث تشدید بیماری هموفیلی و ایجاد خونریزی های شدید شده و در روند درمانی این بیماری اختلال ایجاد می کند، علاوه بر این هزینه های زیادی را برای بیماران به دنبال خواهد داشت. با توجه به اهمیت مهارکننده ها، در این مطالعه، برای اولین بار ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن های IGSF2 و $TNF\alpha$ و خطر توسعه مهارکننده ها 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 مراجعه کننده به مرکز درمان جامع هموفیلی ایران و

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 مهار کننده بودند. پس از اخذ کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.139567، از هر یک از افراد مورد مطالعه رضایت نامه آگاهانه گرفته شد. نمونه خون وریدی بیماران با نسبت ۹ به ۱ با سترات سدیم (ماده ضد انعقاد خون) ۳/۲ گرم بر دسی لیتر به خوبی مخلوط گردید. برای جدا کردن پلاسما، نمونه ها با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند.

تشخیص مهارکننده های فاکتور VIII در بیماران هموفیلی A

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

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از نمونه های 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. هم چنین آنزیم پروتئیناز K جهت از بین بردن پروتئین ها استفاده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. از ستون های 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 اندازه گیری شد.

طراحی پرایمر

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

بررسی پلی مورفیسم های مرتبط با مهار کننده

جهت بررسی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) احتمالی در ژن های مورد نظر، واکنش Tetra ARMS-PCR صورت گرفت تا علاوه بر تعیین وجود پلی مورفیسم، جایگاه آن نیز مشخص شود. یک جفت پرایمر (آغازگر رو به جلو بیرونی و معکوس داخلی) باعث تکثیر قطعه ای می شود که حاوی آلل G است و جفت دیگر پرایمر (آغازگر رو به جلو داخلی و معکوس بیرونی) باعث تکثیر قطعه ای می شود که حاوی آلل A است. پرایمرهای بیرونی برای حالت های هموزیگوت و هتروزیگوت یک قطعه یکسان می دهد و این قطعه به عنوان کنترل برای تمام نمونه ها به کار می رود (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 ژن های IGSF2 و

قرار گرفت. برای بررسی ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ استفاده شد. برای بررسی فراوانی هر آلل و ژنوتیپ پلی مورفیسم ژن‌های IGSF2 و TNF α 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 $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین مهارکننده‌های فاکتور VIII توسط تست بتسدا

در این روش به منظور تهیه و جداسازی پلاسما، نمونه‌ها با دور ۴۰۰۰ rpm 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 نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های IGSF2 و TNF α 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 ۱/۸-۲ 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 ژن‌های IGSF2 و TNF α از روش الکتروفورز با ژل آگارز دو درصد استفاده شد

TNF α به ترتیب آورده شده است. حجم کلی هر واکنش ۲۰ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانو گرم بوده است. شرایط واکنش Tetra ARMS-PCR شامل مراحل دناتوره شدن به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵°C و طویل سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°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 توالی یابی از نظر وجود پلی مورفیسم موردنظر با برنامه Snap gene و Blast بررسی گردید.

جدول شماره ۱: پرایمرهای طراحی شده و مشخصات آن‌ها برای ژن TNF α

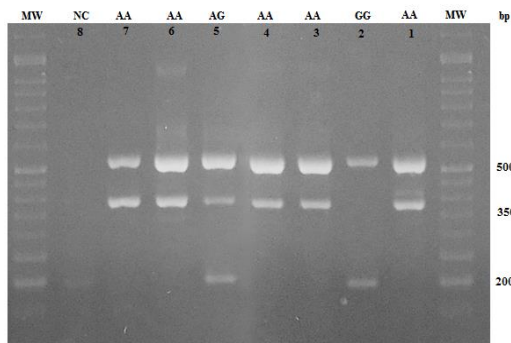
IGSF2 (rs2296449)	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای ذوب °C
Forward inner primer (G allele)	AGCTGATTGCTCAAGTTGGTTAAATGTATG	۲۱۳	۶۸
Reverse inner primer (A allele)	AGACAGGGAGGGTCTCTGGGAACGT	۳۵۸	۷۰
Forward outer primer (5' - 3')	AAAGTGACAGGAGGGTTTATGGGGTGA	۵۱۵	۶۹
Reverse outer primer (3' - 5')	AGAGAATCTTGGATGGACTCTGCTGCAG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

جدول شماره ۲: پرایمرهای طراحی شده و مشخصات آن‌ها برای ژن TNF α

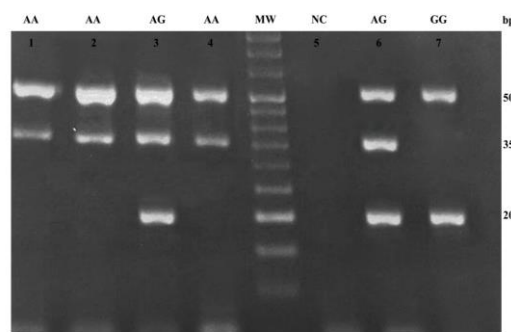
TNF α (rs1800629)	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	دمای ذوب °C
Forward inner primer (G allele)	GGAGGCAATAGGTTTGTAGGGGCAGGG	۲۰۹	۷۴
Reverse inner primer (A allele)	GTAGGACCCCTGGAGGCTGAACCCCGTACT	۳۵۲	۷۴
Forward outer primer (5' - 3')	GTCTGTGAATTCCCGGGGTGATTTCAC	۵۰۵	۷۴
Reverse outer primer (3' - 5')	GGCCCTGCACCTTCGTCTCGGTTTCIT		۷۴

ارتباط مهارکننده‌ها با داده‌های درمانی

ارتباط بین ازدواج فامیلی و عفونت با ویروس هپاتیت C با میزان مهارکننده، علاوه بر ارتباط بین پاسخ به درمان و میزان واحد بتسدا از نظر آماری مورد ارزیابی



تصویر شماره ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن IGSF2: ستون های ۱-۴ (نمونه های دارای مهار کننده). ستون های ۵-۷ (نمونه های بدون مهار کننده). ستون ۸ 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، فرمتناز). ژل الکتروفورز ۲ درصد می باشد



تصویر شماره ۲: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن TNF α : ستون های ۱-۴ (نمونه های دارای مهار کننده). ستون های ۵ و ۶ (نمونه های بدون مهار کننده). ستون ۷ 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، فرمتناز). ژل الکتروفورز ۲ درصد می باشد

که در تصویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج PCR برای ژن IGSF2، باندهایی با اندازه های 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 TNF α ، باندهایی با اندازه های 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 TNF α

در ابتدا بررسی فراوانی ژنوتیپ های ژن های IGSF2 و TNF α توسط تعادل هاردی-واینبرگ انجام شد و صحت آن ها مورد تایید قرار گرفت. سپس، فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های پلی مورفیسم تک نوکلئیدی ژن های مذکور مورد آنالیز قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ های ژن های IGSF2 و TNF α و نیز آلل ها در دو گروه دارای مهار کننده و بدون مهار کننده در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، تفاوت معنی داری بین این دو گروه در ارتباط با ژن IGSF2 وجود دارد ($p < 0/05$) ولی در ارتباط با ژن TNF- α تفاوتی مشاهده نشد ($p > 0/05$).

آنالیز سایر داده های درمانی

بررسی ارتباط بین ازدواج فامیلی و میزان مهار کننده در افراد مورد مطالعه معنی دار بوده است ($p = 0/026$). آنالیز آماری بین عفونت با ویروس هپاتیت C و میزان

جدول شماره ۳: توزیع ژنوتیپ و فراوانی آلل های پلی مورفیسم تک نوکلئیدی ژن های IGSF2 و TNF α در دو گروه

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

* CI: confidence interval

مهارکننده در دو گروه ارتباط معنی داری را نشان داد ($p = 0/006$). در جدول شماره ۴ این بررسی ها 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 معنی داری وجود داشت ($p = 0/002$).

جدول شماره ۴: مقایسه داده های درمانی در دو گروه دارای مهارکننده و بدون مهارکننده

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

بحث

این مطالعه، برای اولین بار بر روی ژنوتیپ های ژن های IGSF2 و TNF α و بررسی میزان مهارکننده در بیماران با هموفیلی A در ایران، انجام گرفته است. با مقایسه فراوانی ژنوتیپ ها در دو گروه دارای مهارکننده و بدون مهارکننده با توجه به $p = 0/018$ اختلاف معنی داری در ژن IGSF2 به دست آمد. در آنالیز ژن TNF α تفاوت معنی داری در مقایسه ژنوتیپ ها و آلل ها در دو گروه مشاهده نگردید ($p > 0/05$). در بررسی میزان ریسک خطر (OR) ژنوتیپ ها و آلل ها در مقایسه با ژنوتیپ و آلل گروه رفرنس، هیچ برتری برای این ژنوتیپ ها نسبت به یکدیگر در دو گروه مورد مطالعه با توجه به $p > 0/05$ به دست نیامد. با توجه به مطالعات بالینی، در درمان بیمارانی که مهارکننده دارند دو هدف، یکی کنترل خونریزی های حاد شدید و دیگری ایجاد تحمل ایمنی یا حداقل تبدیل کردن یک پاسخ دهنده قوی به یک پاسخ دهنده ضعیف با از بین بردن آنتی بادی ها، وجود دارد. هدف اصلی در درمان خونریزی های حاد،

رسیدن به سطح قابل ملاحظه ای از فاکتور VIII در جریان خون می باشد که غلظت آنتی بادی بیمار عامل مهمی در این خصوص می باشد. بیمارانی که دارای مهارکننده با پاسخ پایین به درمان هستند باید با تیر بالای فاکتور انعقادی درمان شوند تا فعالیت مهارکننده خنثی و خونریزی درمان شود. در بیمارانی که واکنش ایمنی شدید دارند هنگامی که تیر آنتی بادی پایین (کم تر از ۵ واحد بتسدا) است، می توان یک ماده سیتوتوکسیک مانند سیکلوفسفامید به همراه دوز های بالای فاکتور تزریق نمود و گاهی نیز از کنسانتره کمپلکس پروترومین فعال و یا فاکتور هفت نو ترکیب استفاده کرد. کارایی دوز فاکتور هفت نو ترکیب و یک دوز پروترومین فعال شده با هم برابر است که برای درمان بیماران با مهارکننده استفاده می شود (۱۶). در بیماران با هموفیلی شدید A برای از بین بردن مهارکننده از روش القاء تحمل ایمنی استفاده می شود (۱۷). در مطالعه ای که توسط Ding و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین انجام گرفت، سلول های T تنظیمی CD4⁺CD25⁺ و سطح سلول های مونونوکلئور خون محیطی و فاکتور رونویسی Foxp3⁺ با فلوسایتومتری اندازه گرفته شد و سهم CD4⁺CD25⁺ در بیماران با مهارکننده بیش تر 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 سلول های تنظیمی CD4⁺CD25⁺ اندازه گرفته شد. میزان این سلول ها 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 معنی داری را در ژنوتیپ ژن IGSF2 در دو گروه دارای مهارکننده و بدون مهارکننده نشان

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 مهارکننده 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-4، IL-5، IL-10 و TNF α (A-308G)، بررسی شد. میزان مهارکننده توسط روش نایمگن اندازه گرفته شد. نتیجه بررسی ژنوتیپ هیچ ارتباطی را بین توسعه مهارکننده و ژنوتیپ TNF α ، IL-4، IL-5، 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 TNF α ، با خطر توسعه مهارکننده در ۵۲ کودک مبتلا به هموفیلی شدید A که با فاکتورهای نو ترکیب درمان شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری در مورد پلی‌مورفیسم ژن TNF α (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 TNF α ، این مطالعه در راستای تحقیقات Chaves (۲۳) و Pergantou (۲۴) قرار گرفت. 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 تأثیر 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 مهارکننده‌ها 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 مهارکننده 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 میرآخوری، دکتر محمد جاذبی، دکتر علیرضا عزیزی و خانم سمیه معززی تشکر و قدردانی نمایند.

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*. 2nd ed. New York: 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, Gekus 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, Collocutt 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.

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.