Original Article

Polymorphism analysis of the CTLA-4 (rs231775) gene as a marker of inhibitor development in Iranian patients with hemophilia A

Keshavarz-Norouzpour M[1], Bolhassani A[2,3*], Sari S[1]

1- Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.
2- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.
3- Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2017/08/25 | Accepted: 2017/12/23

Abstract:

Background: Development of factor VIII (FVIII) inhibitor is the main problem of replacement therapy in patients with hemophilia A. Recently, the correlation of polymorphisms of some genes involved in immune system has been determined with inhibitor development. The reports showed that cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) plays an important role in regulating T cell activation and thus, CTLA-4 gene polymorphism is related to genetic susceptibility to various autoimmune diseases. This study aimed at investigating the correlation between polymorphism of CTLA-4 gene and inhibitor development in Iranian hemophilia A patients for the first time.

Materials and Methods: In this case-control study, the genomic DNA was extracted from blood samples of 55 inhibitor positive and 45 inhibitor negative hemophilia A patients. Then, the genotyping of the CTLA-4 gene was performed using the Tetra Primer ARMS PCR. Moreover, the validation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CTLA-4 gene was determined by DNA sequencing. On the other hand, the role of HCV infection was determined in inhibitor-positive and inhibitor-negative HA patients.

Results: Results showed that no statistically significant difference was observed between the genotypic and allelic frequencies with the presence of inhibitors ($P>0.05$). Moreover, a significant correlation was observed between HCV infections and development of inhibitors ($P<0.05$).

Conclusion: The CTLA-4 gene polymorphism does not play a role for inhibiting coagulation factor in Iranian patients with hemophilia type A.

Keywords: Hemophilia A, Inhibitor, CTLA-4, Tetra ARMS PCR

* **Corresponding Author.**
Email: azam.bolhassani@yahoo.com
Tel: 0098 912 537 3264
Fax: 0098 216 646 5132

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2018; Vol. 22, No 1, Pages 75-82

Please cite this article as: Keshavarz-Norouzpour M, Bolhassani A, Sari S. Polymorphism analysis of the CTLA-4 (rs231775) gene as a marker of inhibitor development in Iranian patients with hemophilia A. ***Feyz*** 2018; 22(1): 75-83.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

آنالیز پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 به‌عنوان مارکر توسعه مهارکننده‌ها در بیماران ایرانی مبتلا به هموفیلی نوع A

معصومه کشاورز نوروزپور [۱]، اعظم بوالحسنی [۳،۲*]، سویار ساری [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: بروز مهارکننده علیه فاکتور انعقادی VIII اصلی‌ترین مشکل درمان بیماران مبتلا به هموفیلی A است. اخیرا ارتباط پلی-مورفیسم‌های برخی از ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی با توسعه مهارکننده‌ها مشخص شده است. گزارش‌ها نشان داده‌اند که آنتی‌ژن ۴ وابسته به لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTLA-4) نقش مهمی در تنظیم فعالیت سلول T برعهده داشته و بنابراین پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 با استعداد ژنتیکی به بیماری‌های گوناگون خودایمنی مرتبط می‌شود. در این مطالعه برای اولین بار ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 و توسعه مهارکننده در بیماران هموفیل نوع A ایرانی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی DNA ژنومی از نمونه‌های خون ۵۵ بیمار هموفیلی A دارای مهارکننده و ۴۵ بیمار هموفیلی A بدون مهارکننده استخراج شد. سپس، تعیین ژنوتیپ ژن CTLA-4 با استفاده از روش Tetra Primer ARMS PCR انجام شد. به‌علاوه، پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن CTLA-4 با استفاده از روش توالی‌یابی DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. از-طرف دیگر، نقش فاکتور محیطی ابتلا به عفونت HCV در بیماران هموفیل دارای مهارکننده و بدون آن تعیین شد.

نتایج: یافته‌های مطالعه نشان داد که هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین بروز مهارکننده‌ها با آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف ژن CTLA-4 وجود ندارد ($P>۰/۰۵$). به‌علاوه، تفاوت معنی‌داری بین ابتلا به عفونت HCV و توسعه مهارکننده‌ها مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 در ایجاد مهارکننده علیه فاکتور انعقادی در بیماران ایرانی با هموفیلی نوع A نقشی ندارد.

واژگان کلیدی: هموفیلی A، مهارکننده، CTLA-4، Tetra ARMS PCR

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۹۷، صفحات ۸۲-۷۵

مقدمه

بیماری هموفیلی یکی از شایع‌ترین و شدیدترین اختلالات ارثی خونریزی‌دهنده می‌باشد. دو نوع بیماری هموفیلی A (کمبود فاکتور VIII) و هموفیلی B (کمبود فاکتور IX) اختلالات انعقادی هستند که به‌صورت وابسته به جنس به ارث می‌رسند و تظاهرات بالینی مشابهی دارند. مشخصه این بیماری‌ها از نظر بالینی خونریزی مفصلی و بافت نرم می‌باشد [۱]. مواردی که برای درمان هموفیلی به‌کار برده می‌شوند، شامل کنسانتره فاکتور VIII، کنسانتره‌های فاکتور انعقادی به‌دست آمده از پلاسما و فاکتورهای انعقادی نوترکیب است [۳،۲].

ازجمله عوارض درمان در افراد هموفیلی می‌توان به ایجاد مهار-کننده علیه فاکتورهای انعقادی اشاره کرد. مهارکننده‌ها از نوع آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG4 هستند که به دومین‌های عملکردی فاکتورهای VIII و IX متصل شده و فعالیت‌های انعقادی آنها را خنثی می‌کنند. اختلالات ژنتیکی که منجر به ایجاد هموفیلی A می‌شوند متشکل از حذف، وارونگی ژنی، جهش‌های نقطه‌ای و جابه‌جایی است [۳]. عوامل خطر ژنتیکی اولیه که بر گسترش مهار-کننده‌ها اثر می‌گذارند، جهش‌های مربوط به ژن فاکتور VIII هستند [۴]. به‌غیر از جهش احتمالی در فاکتور VIII، پلی‌مورفیسم در ژن‌های مختلف مانند مولکول‌های لکوسیت آنتی‌ژن کلاس II انسانی و پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در ژن‌های پاسخ ایمنی انسانی مثل IL-10، TNF-α، CTLA-4 و ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی، به‌عنوان عوامل خطر ایجاد مهارکننده در بیماری هموفیلی نوع A مطرح شده‌اند. علاوه بر فاکتورهای ژنتیکی، فاکتورهای محیطی شامل بیماری‌ها، واکسن‌ها، عفونت‌ها و جراحی‌ها نیز در ایجاد مهارکننده‌ها نقش دارند [۸-۵]. گزارش‌ها نشان داده‌اند که اختلال ایمونولوژیک اتوآنتی‌بادی‌ها علیه اجزای سلولی منجر به فعال شدن آبشاری از واکنش‌های ایمونولوژیک و التهابی شده و درنهایت موجب بروز بسیاری از بیماری‌ها در اندام‌های مختلفی از قبیل کلیه‌ها، قلب،

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش بیوشیمی، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] دانشیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

[۳] دانشیار ، مرکز درمان جامع هموفیلی ایران، تهران، ایران

[۴] استادیار، گروه آموزشی علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

تلفن: ۰۹۱۲۵۳۷۳۲۶۴ دورنویس: ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۳۲

پست الکترونیک: azam.bolhassani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۳ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۲

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

ریه، مفاصل و سیستم ایمنی می‌شوند [۹]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تنظیم دقیق تکثیر لنفوسیت‌های T نقش مهم و حیاتی در پاسخ ایمنی ایفا می‌کند. در این ارتباط، گیرنده‌هایی همچون مولکول B7.1 در ایجاد سیگنال برای مهار لنفوسیت‌ها مؤثر هستند و این کار را با اتصال به مولکول CTLA-4 بیان شده در سطح لنفوسیت‌های T انجام می‌دهند [۱۲-۱۰]. در موارد التهاب خود-ایمنی، CTLA-4 گیرنده سلول‌های T را تضعیف می‌کند تا از پاسخ‌های ایمنی ناخواسته جلوگیری کند [۱۴،۱۳]. مولکول CTLA-4 یا CD152 یک گلیکوپروتئین درون‌غشایی نوع یک و عضو خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها است که دارای ۲۲۳ اسید آمینه ساختاری و ۳۴ اسید آمینه به‌عنوان پپتید سیگنال دهنده می-باشد [۱۵،۱۴]. این مولکول به‌صورت هومودایمر با پیوند کووالانی بر سطح لنفوسیت‌های T فعال متصل می‌شود [۱۷،۱۶]. علاوه بر لنفوسیت T، این مولکول در سطح سلول‌های B، مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های بنیادی وجود دارد [۱۸]، ولی عملکرد آن در این سلول‌ها نامعلوم است. مکان ژن CTLA-4 در 2q33 می‌باشد. اتصال آنتی‌بادی ضدمولکول CTLA-4 به مولکول مذکور باعث افزایش تولید اینترلوکین-۲ (IL-۲) توسط سلول‌های T و نیز افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌گردد [۱۹]. در مطالعه Fidanci و همکارانش مشاهده شده است که پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های مرتبط با پاسخ سیستم ایمنی، IL-5، IL-4، IL-6، IL-10 و CTLA-4 موجب افزایش حضور مهارکننده‌ها در بدن می‌شوند [۴]. باتوجه به مطالعات انجام شده، تعدادی از SNPهای مرتبط با افزایش خطر گسترش مهارکننده، روی ژن CTLA-4 واقع شده‌اند؛ بنابراین، باتوجه به اهمیت این ژن در سیستم ایمنی، پلی-مورفیسم آن در افراد هموفیلی A بررسی شد. به‌علاوه، ارتباط بین توسعه مهارکننده با ابتلا به عفونت ویروس هپاتیت C به‌عنوان یک فاکتور محیطی در بیماران هموفیل ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری:

این مطالعه به‌صورت مورد-شاهدی و با دریافت ۵ میلی-لیتر خون از ۱۰۰ نفر بیمار هموفیل مراجعه‌کننده به مرکز درمان جامع هموفیلی، ساکن تهران و سایر شهرستان‌ها، انجام پذیرفت. کلیه افراد مورد مطالعه در جریان اهداف طرح تحقیقاتی قرار گرفته و فرم رضایت‌نامه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی توسط آنها تکمیل گردید (کد اخلاق: IR.IAU.PS.REC.1395.58).

تست بتسدا:

به‌منظور تعیین وجود یا عدم وجود مهارکننده فاکتور انعقادی و اندازه‌گیری سطح آن در بدن بیمار از تست بتسدا استفاده شد که اساس آن مخلوط‌سازی پلاسمای نرمال و پلاسمای بیمار و ارزیابی فاکتور می‌باشد. برای اندازه‌گیری مهارکننده فاکتور انعقادی از روش Nejmegen شامل بومن آلبومین (جهت حفظ پروتئین‌ها، سیگما، آلمان) و بافر ایمیدازول و نرمال پلاسما استفاده شد. درنهایت پس از ۲ ساعت انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷°C با استفاده از کیت BIOPHEN (آلمان)، به کمک دستگاه Co-agolation نمودار مربوطه رسم شد و سپس نمونه‌ها داخل دستگاه قرار داده شد تا میزان دقیق فاکتور مربوطه اندازه‌گیری شود. با استفاده از این روش، از میان ۱۰۰ بیمار هموفیلی A مراجعه‌کننده به کانون هموفیلی ایران، ۵۵ نفر دارای مهارکننده و ۴۵ نفر هموفیلی A بدون مهارکننده به‌عنوان کنترل تعیین شدند. لازم به‌ذکر است که در برخی قسمت‌های متن برای سادگی بیان به‌جای گروه بیمار دارای مهارکننده از واژه بیمار و به‌جای گروه بیمار بدون مهارکننده از واژه کنترل استفاده شده است.

استخراج DNA:

DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون افراد با استفاده از کیت استخراج GF-1 (تایوان) استخراج شد. جهت ارزیابی کمیت و کیفیت DNA از دستگاه نانودراپ استفاده گردید.

طراحی پرایمر:

توالی ژن CTLA-4 از بانک ژن استخراج شد. سپس، پرایمرهای مناسب طراحی شده و سنتز آنها توسط شرکت پیشگام (ایران) انجام شد. برای بررسی پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 از روش Tetra Primer ARMS PCR استفاده گردید. برای انجام PCR جهت تکثیر DNA مورد نظر از ۲ زوج پرایمر داخلی و خارجی ذیل استفاده شد:

CTLA-4 –F $_{(inner)}$: 5'-CCA AGT CTC CAC TTA GTT ATC CAG ATC ATC -3' (30mer)
CTLA-4 –R $_{(inner)}$: 5'-TTT GAA ACT GAA GCT TCA TGT TCA CTG TA-3' (29mer)
CTLA-4 –F $_{(outer)}$: 5'-AAC TTA TTT GTA AAG CTG TCA AGG GAC CA-3' (29mer)
CTLA-4 –R $_{(outer)}$: 5'-AAC TTA TTT GTA AAG CTG TCA AGG GAC CA-3' (29mer)

واکنش Tetra Primer ARMS PCR و توالی‌یابی:

برای انجام این واکنش در یک میکروتیوب با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر برای هر نمونه DNA موارد ذیل به‌ترتیب اضافه شد: هر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

۲۰ میکرولیتر از مخلوط تکثیری PCR، حاوی یک میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم، ۱۰ میکرولیتر Master Mix (حاوی آنزیم Taq پلیمراز، بافر و dNTP، فرمنتاز، آلمان)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه بود. مخلوط حاصل برای ۳۵ سیکل تحت فرآیند PCR قرار گرفت. این فرآیند شامل ۳۰ ثانیه دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال پرایمر به توالی DNA در دمای ۶۳ درجه و ۳۰ ثانیه طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از تکثیر، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد. به‌علاوه، جهت تایید تعیین ژنوتیپ، یک نمونه از هتروزیگوت و یک نمونه از هموزیگوت‌ها به همراه پرایمر مورد نظر جهت توالی‌یابی به‌روش سنگر به شرکت پیشگام ارسال شدند. سپس، نتایج توالی‌یابی از نظر وجود پلی‌مورفیسم مورد نظر با برنامه Snap gene و Blast بررسی گردید.

بررسی فاکتور بالینی ابتلا به HCV:

در این مطالعه علاوه بر تعیین پلی‌مورفیسم، ارتباط بین توسعه مهارکننده با ابتلا به ویروس هپاتیت C به‌عنوان یک فاکتور محیطی و بالینی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری:

نتایج داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری مربوطه به‌صورت داده‌های عددی تبدیل شده و برای تجزیه و تحلیل از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ استفاده گردید. تمام محاسبات با استفاده از آزمون‌های مجذور کای و رگرسیون لجستیک انجام شد. برای تمامی آنالیزها ارزش $P<۰/۰۵$ معنی‌دار درنظر گرفته شد.

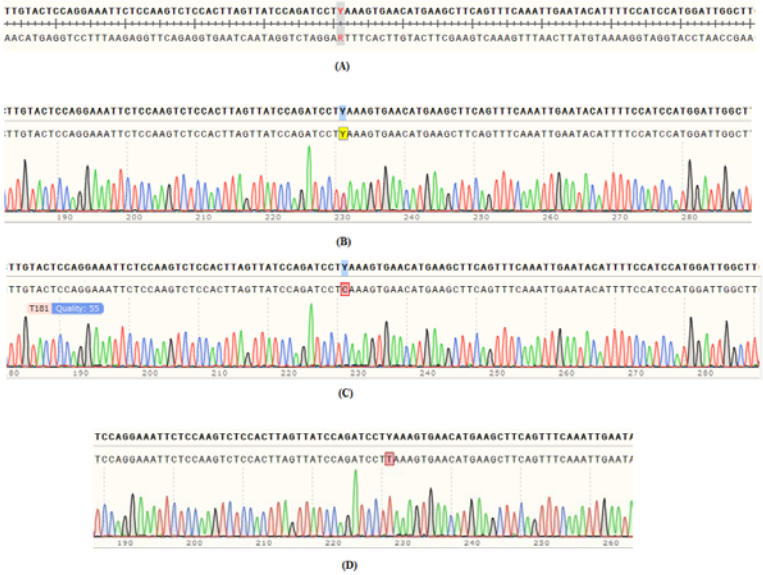
نتایج

بررسی کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ:

غلظت و خلوص DNA استخراج شده از خون افراد هموفیل دارای مهارکننده و بدون مهارکننده توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد؛ تمامی نمونه‌ها غلظت مناسبی داشتند. نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ که بیانگر کیفیت DNA است، حدود ۱/۸۵ و نیز نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰/۲۳۰ که نشان‌دهنده عدم آلودگی پروتئین است، حدود ۲ به‌دست آمد.

بررسی پلی مورفیسم ژن CTLA-4:

در این بررسی ژنوتیپ ژن CTLA-4 برای ۵۵ بیمار مبتلا به هموفیلی A دارای مهارکننده و ۴۵ بیمار مبتلا به هموفیلی A بدون مهارکننده به‌عنوان گروه کنترل توسط تکنیک Tetra Primer ARMS PCR بررسی شد. نتایج الکتروفورز محصول تکثیر ژن نشان داد که اندازه‌های ۴۲۸ جفت باز مربوط به پرایمر خارجی، ۲۹۲ جفت باز مربوط به آلل T و ۱۹۵ جفت باز مربوط به آلل C می‌باشد. نتایج به‌دست آمده توسط تعیین توالی ناحیه مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار SnapGene و سایت NCBI از نمونه‌های دارای مهارکننده و بدون مهارکننده تأیید شدند. تصویر شماره ۱ نتایج حاصل از تعیین توالی ژن CTLA-4 را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۱- نتایج تعیین توالی آنالیز شده توسط نرم‌افزار SnapGene: ژنوتیپ گروه کنترل (بدون مهار کننده، A)، ژنوتیپ CT گروه دارای مهار کننده (B)، ژنوتیپ CC گروه دارای مهارکننده (C) و ژنوتیپ TT گروه دارای مهارکننده (D)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

نتایج نشان داد که از میان ۵۵ نفر فرد مبتلا بـه همـوفیلی A دارای مهارکننده، ۳۴ نفـر (۶۱/۸ درصـد) ژنوتیـپ CC، ۱۶ نفـر (۲۹/۱ درصد) ژنوتیپ CT و ۵ نفر (۹/۱ درصد) ژنوتیـپ TT را نشـان دادند. این مقادیر در مورد افراد کنتـرل بـه‌ترتیـب ۲۹ نفـر (۶۴/۴ درصد)، ۱۱ نفر (۲۴/۴ درصد) و ۵ نفر (۱۱/۱ درصد) بود (جدول شماره ۱). نتایج حاصل از نرم‌افزار SPSS و آزمون مجذور کـای نشان داد کـه تفـاوت معنـی‌داری در فراوانـی ژنوتیـپ‌هـای ژن CTLA-4 بین بیماران دارای مهارکننده و بیماران بدون مهارکننده وجود ندارد ($P>۰/۰۵$).

جدول شماره ۱- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های rs231775 در دو گروه کنترل و بیمار

گروه	SNP (rs231775) CC تعداد(درصد)	CT تعداد(درصد)	TT تعداد(درصد)	جمع	P
کنترل	۲۹ (٪۶۴,۴)	۱۱(٪۲۴,۴)	۵(٪۱۱,۱)	۴۵	۰/۸۵۰
بیمار	۳۴ (٪۶۱,۸)	۱۶(٪۲۹,۱)	۵(٪۹,۱)	۵۵	

همچنین، از میان ۵۵ نفر مورد مطالعه در بیماران هموفیلی A دارای مهارکننده، ۸۴ نفر (۷۶/۳ درصد) آلل C و ۲۶ نفر (۲۳/۶ درصـد) آلل T داشتند. این درصد در مورد افراد کنترل بـه‌ترتیـب ۶۹ نفـر (۷۶/۷ درصد) و ۲۱ نفر (۲۳/۳ درصد) بـود (جـدول شـماره ۲). مقایسه آلل‌ها در بیماران و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشـان نداد ($P>۰/۰۵$).

جدول شماره ۲- مقایسه فراوانی آلل‌های rs231775 در دو گروه کنترل و بیمار

گروه	SNP(rs231775) C(frequency) تعداد(درصد)	T(frequency) تعداد(درصد)	جمع	P
کنترل	۶۹(۷۶/۷)	۲۱(۲۳/۳)	۹۰	۰/۵۴۸
بیمار	۸۴(۷۶/۳)	۲۶(۲۳/۶)	۱۱۰	

بررسی ارتباط عفونت HCV با توسعه مهارکننده:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروه مهارکننده ۲۳ نفر آلوده به ویروس هپاتیت C بوده، ۱۶ نفر مشکوک به آلودگی بودند و ۱۶ نفر مبتلا به این ویروس نبودند، درحالی‌که در گروه بدون مهارکننده ۱۸ نفر آلوده به ویروس، ۳ نفر مشکوک به آلودگی و ۲۴ نفر بدون آلودگی بودند. آنالیز آماری بین عفونت با ویروس هپاتیت C و توسعه مهارکننده ارتباط معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ($P=۰/۰۰۶$).

بحث

در برخی از بیماران هموفیلی A مهارکننده‌هـایی از نـوع آنتی‌بادی‌های IgG1 و IgG4 بیان شده و با فاکتور انعقادی VIII برهم‌کنش داشته و مـانع از عملکـرد آن مـی‌شـوند. در حقیقـت، مهارکننده‌های انعقاد خون مـواد پـاتولوژیکی هستند که بـه‌طـور مستقیم فاکتورهـای انعقـادی را خنثـی مـی‌کننـد. بیمارانی که به اخـتلالات شدید ژنی ماننـد وارونـه شـدن، حـذف و جهـش‌های تغییردهنده چهارچوب ژنی دچار هستند، مهارکننـده فاکتور انعقادی با احتمال بالاتری در آنها تشـکیل مـی‌شـود [۲۰]. وجـود مهارکننـده بدین‌معنی است که فاکتورهای انعقادی پـس از تزریـق به‌سرعت توسط بدن مصرف می‌گـردنـد، لـذا بـرای کنتـرل خونریزی به مقادیر بیشتر و زمان استفاده طـولانی‌تـری از فـاکتور نیـاز است. گرچه بیماران دارای مهارکننده ضـرورتا بـه‌طـور دایم دچـار خـونریزی نمـی‌شـوند، امـا کنتـرل حـوادث خونریزی‌دهنده در آنهـا سخت‌تر و شـدت خـونریزی در آنهـا شدیدتر اسـت [۲۱]. براساس گزارش‌های جهانی، شیوع مهارکننده در کل، ۱۰-۵ درصـد و در بیمـاران بـا هموفیلی شـدید، ۱۵-۱۰ درصد ذکر گردیـده اسـت [۲۲]. وجود مهارکننـده فـاکتور VIII همچنان یکی از مشکلات جدی در درمان همـوفیلی A بـه‌شـمار مـی‌آیـد [۲۳]. شـیوع مهارکننـده در انـواع مختلـف همـوفیلی متفـاوت اسـت [۲۳]. در حقیقـت، شـیوع مهارکننـده در نـوع شـدید هموفیلی بیشتر از انواع متوسط یا خفیف آن اسـت [۲۴]. در طول عمر یک فرد مبتلا به هموفیلی خطر پیشرفت مهارکننده‌ها متغیر است. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکـه خطـر توسـعه مهارکننده‌ها بعد از اولین تزریق در بالاترین سطح خود قـرار دارد [۲۵]. Rothschild و همکاران وجود مهارکننـده در افراد مبتلا به هموفیلی را یکی از بزرگترین مشکلات درمانی ذکر نموده‌انـد [۲۶]. میـزان بـروز مهارکننـده در بررسی مهدی‌زاده و همکاران در سـال ۲۰۰۸ در تهـران ۸/۵ درصـد [۲۷]، در پـژوهش Schoppman و همکـاران ۱۳/۶درصـد [۲۸]، در مطالعـه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

Kasper و همکاران ۱۴/۳ درصد [۲۹]، در تحقیق شریفیان و همکاران ۱۴/۴ درصد [۳۰]، در پژوهش زاهدی و همکاران در کرمان ۱۹/۶ درصد [۳۱]، در بررسی Ehrenforth و همکاران ۲۴ درصد [۳۲] و در مطالعه Anderson و همکاران ۲۵ درصد گزارش گردیده است [۳۳]. اخیراً، ارتباط بین پلی-مورفیسم برخی از ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی و التهاب با ایجاد مهارکننده‌ها به اثبات رسیده است. یکی از پروتئین‌های مورد بحث در این سیستم، پروتئین CTLA-4 است. پروتئین CTLA-4 یک مولکول سطحی است که روی سلول‌های T فعال شده بیان شده و نقش مهمی در کاهش فعالیت سلول T دارد. تاثیر پلی-مورفیسم‌های این ژن در بیماری‌های خودایمنی و سرطان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش‌هایی مبنی بر درصد بالای آلل G در موقعیت 49A/G+ در بیماری‌های خودایمنی وجود دارد [۳۴]. همچنین، در مورد بیماران هموفیلی اگرچه علت بروز مهارکننده‌ها تاکنون ناشناخته باقی‌مانده است، اما برخی شواهد نشان می‌دهد پلی‌مورفیسم C/T ژن CTLA-4 نقش مهمی در القای مهارکننده‌ها ایفا می‌کند [۳۷-۳۵]؛ درحالی‌که برخی دیگر هرگونه ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 و بروز مهارکننده را رد کرده‌اند [۳۸،۳۷]. در بررسی حاضر نتایج نشان داد که ژنوتیپ CC (۶۱/۸ درصد) فراوانی بیشتری در بیماران هموفیل دارای مهارکننده دارد، اما ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم C/T و بروز مهارکننده‌ها یافت نشد. نتیجه حاصل مشابه با بررسی‌ای بود که در سال ۲۰۱۲ در کشور چین انجام شد. آنها نیز گزارش کردند که CC (۷۷/۲ درصد) فراوانی بیشتری در بیماران هموفیل دارای مهارکننده دارد. به‌علاوه، فراوانی آلل C در بیماران دارای مهارکننده و در بیماران بدون مهارکننده، به‌ترتیب ۹۲/۱ و ۸۵/۲ درصد گزارش شد و ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم C/T و بروز مهارکننده‌ها یافت نشد [۳۹]. در مطالعه حاضر نیز آلل C با ۷۶/۳ درصد در بیماران دارای مهارکننده و ۷۶/۷ درصد در بیماران بدون مهارکننده بیشترین شیوع را نشان داد و هیچ ارتباط معنی-داری بین فراوانی آلل‌ها و ایجاد مهارکننده‌ها یافت نشد. بنابراین، برخلاف نتایج برخی محققان مبنی بر تأثیر پلی‌مورفیسم ژن CTLA-4 روی القای مهارکننده در افراد هموفیل، در جمعیت ایرانی مشابه برخی مطالعات انجام شده در چین، هند و ایتالیا ارتباطی یافت نشد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که هر دو فاکتور ژنتیکی و محیطی می‌توانند در ایجاد مهارکننده‌ها نقش داشته باشند. فاکتورهای محیطی شامل بیماری‌ها، واکسن‌ها، عفونت‌ها و جراحی‌ها است و فاکتورهای ژنتیکی شامل تاریخچه خانوادگی، جهش‌های ژنتیکی، ژن‌های پاسخ ایمنی، پلی‌مورفیسم ژن‌های سیتوکین‌ها و نژاد و قومیت است [۴۰]. برای مثال، 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 ارتباط بین تشکیل مهارکننده و میزان مرگ‌ومیر مشخص شود. در طول مطالعه ۴۳۲ نفر از شرکت‌کنندگان فوت شدند که ۴۸ نفر آنها دارای مهارکننده بودند. علائم بالینی که باعث مرگ‌ومیر شده بود، شامل افزایش خونریزی‌ها، علائم بیماری‌های کبدی، آلودگی با HCV یا HIV و حضور مهارکننده بود. میزان مرگ‌ومیر در بیماران با مهارکننده ۷۰ درصد بیشتر از بیماران بدون مهارکننده بود [۴۱]. در مطالعه حاضر نیز اختلاف معنی‌داری بین ابتلا به عفونت HCV و توسعه مهارکننده در بیماران هموفیل به‌دست آمد که یافته‌های مطالعه مذکور را تایید می‌کند. به‌طور کلی، باتوجه به اهمیت موضوع مهارکننده‌ها و فقدان اطلاعات کافی در ارتباط با تأثیر عوامل ژنتیکی در بیماران هموفیل ایرانی، بایستی تحقیقات گسترده‌تری صورت گیرد. در حقیقت یافته‌های به‌دست آمده در این تحقیق در آینده بایستی روی پلی‌مورفیسم ژن‌های دیگر دخیل در سیستم ایمنی و ارتباط آنها با القای مهار کننده در افراد هموفیل متمرکز شود. به‌علاوه، باید همکاری مراکز دیگر برای بررسی تعداد نمونه-های بیشتر افراد مبتلا به هموفیلی صورت گیرد که یکی از محدودیت‌ها در انجام پروژه‌های تحقیقاتی است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان داد که ژنوتیپ CC (۶۱/۸ درصد) برای ژن CTLA-4 فراوانی بیشتری در بیماران هموفیل ایرانی دارای مهارکننده دارد. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین پلی-مورفیسم C/T و بروز مهارکننده‌ها در این بیماران وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

References:

[1] de Alencar JB, Macedo LC, de Barros MF, Rodrigues C, Cadide RC, Sell AM, Visentaine JE. Importance of immune response genes in hemophilia A. ***Rev Bras Hematol Hemoter*** 2013; 35(4): 280-6.

[2] Oldenburg J, Ivaskeviciusa V, Rosta S, Fregin A, White K, Holinski-Feder E, et al. Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. ***J Biochem Biophys Methods*** 2001; 47(1-2): 39-51.

[3] Miclea RD, Varma PR, Peng A, Balu-Iyer SV. Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII. ***Biochim Biophys Acta*** 2007; 1768(11): 2890-8.

[4] Fidanci ID, Zulfikar B, Kavakli K, Ar MC, Kilinc Y, Baslar Z, et al. A polymorphism in the IL-5 gene is associated with inhibitor development in severe Hemophilia A patients. ***Turk J Haematol*** 2014; 31(1): 17-24.

[5] Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang X. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. ***Thromb Haemost*** 2012; 107(1): 30-6

[6] Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. ***Blood*** 2006; 108(12): 3739-45.

[7] Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. ***J Thromb Haemost*** 2007; 5(2): 263-5.

[8] 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): 1446-54.

[9] Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. ***Eur J Immunol*** 1988; 18(12): 1901-5.

[10] Maurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1+49) alters T-cell activation. ***Immunogenetics*** 2002; 54(1): 1-8

[11] McCoy KD, Gros GLE. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. ***Immunol Cell Biol*** 1999; 77: 1–10

[12] Riley JL, June CH. The CD28 family: A T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. ***Blood*** 2005; 105(1): 13-21.

[13] Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. ***Nat Rev Mmunol*** 2003; 3(7): 544-56.

[14] Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. ***Immunol Today*** 1997; 18(4): 175-82.

[15] Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. ***Nature*** 1987; 328(6127): 267-70.

[16] Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, Peach R, Leung HT, Rogers J, et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86molecules. ***J Biol Chem*** 1995; 270(25): 15417-24.

[17] Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. ***Int J Cancer*** 2005; 117(4): 538-50.

[18] Pistillo MP, Tazzari PL, Palmisano GL, Pierri I, Bolognesi A, Ferlito F, Capanni P, et al. CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. ***Blood*** 2003; 101(1): 202-9.

[19] Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. ***Annu Rev Immunol*** 2006; 24: 65-97.

[20] Lee CA, Berntrop EE, Keith Hoots W. Text book of hemophilia. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell 2005; 54-80.

[21] Hoyer LW. Why do so many haemophilia A patients develop an inhibitor? ***Br J Haematol*** 1995; 90(3): 498-501.

[22] Vennylen J. How do some hemophiliacs develop inhibitors? ***Hemophilia*** 1988; 4(4): 538-42.

[23] Kreuz W, Becker S, Lenz E, Martinez-Saguer I, Escuriola-Ettingshausen C, Funk M, et al. Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII. ***Semin Thromb Hemost*** 1995; 21(4): 382-9.

[24] Brettler D. Inhibitor of factor VIII and IX. ***Hemophilia*** 1995; 1(1): 35-9.

[25] Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. ***Haemophilia*** 2003; 9(4): 418-35.

[26] Rothschild C, Laurian Y, Satre EP, Borel Derlon A, Chambost H, Moreau P, et al. French previously untreated patients with severe hemophilia A after exposure to recombinant factor VIII: incidence of inhibitor and evaluation of immune tolerance. ***Thromb Haemost*** 1998; 80(5): 779-83.

[27] Mehdizadeh M, Kardoost M, Zamani G, Baghaeepour MR, Sadeghian K, Pourhoseingholi

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]

MA. Occurrence of haemophilia in Iran. ***Haemophilia*** 2009; 15(1): 348-51.
[28] Schoppmann A, Waytes AT. Factor VIII inhibitor and severity of hemophilia. ***Thromb Haemost*** 1996; 76(2): 280-1.
[29] Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. ***Thromb Diath Haemorrh*** 1975; 34(2): 869-72.
[30] Sharifian R, Hoseini M, Safai R, Tugeh Gh, Ehsani AH, Lak M, et al. Prevalence of inhibitors in a population of 1280 hemophilia a patients in Iran. ***Acta Medica Iranica*** 2003; 41(1): 66-8.
[31] Zahedi MJ, Darvish Moghadam S. [Frequency of hepatitis B and C infection among hemophilic patients in kerman (Persian)]. ***J Kerman Univ Med Sci*** 2004; 11(3): 131-5.
[32] Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Günger T, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. ***Lancet*** 1992; 339(8793): 594-8.
[33] Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the IL-10 but not in the IL-1b and IL-4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. ***Blood*** 2006; 107: 3167-72
[34] Ligers A, Teleshova N, Masterman T, HuangWX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. ***Genes Immun*** 2001; 2(3): 145-52.
[35] Wang XB, Zhao X, Giscombe R, Lefvert AK. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. ***Genes Immun*** 2002; 3(4): 233-4.
[36] Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. ***J Thromb Haemost*** 2007; 5 (2): 263-5
[37] Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, et al. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-a and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. ***J Thromb Haemost*** 2009; 7 (12): 2006-15.
[38] Zhang LL, Yu ZQ, Zhang W, Cao LJ, Su J, Bai X, Ruan CG. Relationship between factor VIII inhibitor development and polymorphisms of TNFα and CTLA-4 gene in Chinese Han patients with hemophilia A. ***Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*** 2011; 32(3): 168-72.
[39] Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang X. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. ***Thromb Haemost*** 2012; 107(1): 30-6.
[40] Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. ***Haemophilia*** 2006; 12(6):15-22.
[41] Walsh CE, Soucie JM, Miller CH. Impact of inhibitors on hemophilia A mortality in the United States. ***Am J Hematol*** 2015; 90(5): 400-5.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-14]