پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال ۱۰، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۸۴، صفحات ۲۳۱ تا ۲۳۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۶/۲۵

بررسی رابطه جهش‌های ژن HFE با بیماری هپاتیت خود ایمنی

دکتر محمدرضا آگاه[1*]، دکتر حسین سندی[1]، دکتر مریم ظفرقندی[1]، دکتر طاهره غازیانی[1]، دکتر آرتا آریاپاد[1]، دکتر آزیتا حکمت دوست[1]، دکتر محمدرضا زالی[2]

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به نامشخص بودن زمینه ژنتیکی بیماری هپاتیت خود ایمنی و نقش احتمالی پروتئین HFE در عملکرد سیستم ایمنی، هدف این مطالعه تعیین فراوانی جهش‌های H۶۳D و C۲۸۲Y در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی و ارزیابی اثر این جهش‌ها بر سطح فریتین بود.*

مواد و روش‌ها: *این پژوهش به روش مورد ـ شاهدی در ۶۶ بیمار مبتلا به هپاتیت خود ایمنی و ۱۲۰ شاهد سالم که از نظر سنی و جنسی همسان بودند، انجام شد. DNA با روش Salting-out از نمونه‌های خون استخراج شد و بر اساس روش PCR-RFLP جهش‌ها ارزیابی شدند. جستجوی جهش‌های H۶۳D و C۲۸۲Y در تمام افراد تحت مطالعه به وسیله هضم آنزیمی محصولات واکنش زنجیرهٔ پلیمراز(PCR) به ترتیب از طریق اندونوکلئازهای محدود کنندهٔ Bcl I و Rsa I انجام شد. رابطه آماری هر یک از جهش‌ها با هپاتیت خود ایمنی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *جهش C۲۸۲Y در هر دو گروه بیماران و افراد شاهد وجود نداشت. چهارده (۲۱/۲٪) بیمار و ۲۶ (۲۱/۷٪) شاهد برای جهش H۶۳D هتروزیگوت، و ۲(۳٪) بیمار و ۲(۱/۷٪) شاهد از نظر این جهش هموزیگوت بودند. فراوانی آلل به ترتیب ۱۳/۶ و ۱۲/۵ در بیماران و افراد شاهد بود ($p<0/9$). اختلاف معنی‌داری از نظر سطح فریتین بین بیماران دارای جهش H۶۳D و بیماران فاقد آن دیده نشد.*

نتیجه‌گیری: *جهش‌های H۶۳D و C۲۸۲Y در بین بیماران دچار هپاتیت خود ایمنی و افراد سالم وجود ندارد. نظر به اهمیت علت شناسی هپاتیت خود ایمنی بررسی سایر جهش‌های دخیل توصیه می‌شود.*

واژگان کلیدی: ***هپاتیت خود ایمنی، فریتین، HFE***

مقدمه

می‌شود. جهش دوم هیستیدین موقعیت ۶۳ را به اسید آسپارتیک تبدیل می‌کند (H۶۳ D) اما نقش آن در هموکروماتوز مورد بحث است (۲). پنج تا ۱۵ درصد جمعیت برای C۲۸۲ Y هتروزیگوت هستند و ۲۵-۱۵ درصد نیز ناقل H۶۳ D و C۲۸۲ Y محسوب می‌شوند (۳).

بعضی مطالعات افزایش فراوانی جهش C۲۸۲Y را در بین بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی در مقایسه با جمعیت گزارش کرده‌اند (۵،۴ و۶) در حالی که مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تفاوتی از نظر هپاتیت خود ایمنی بیماری با علت ناشناخته‌ای است که وجود خصوصیات ایمونولوژیک طبیعت خود ایمنی آن را ثابت نمی‌کند. ناتوانی در کامل کردن معیارهای خود ایمنی، تأکید بر طبیعت چند جانبهٔ هپاتیت خود ایمنی دارد و وجود اجزاء مختلف ژنتیک و ایمونولوژیک این بیماری را نشان می‌دهد (۱). HFE اولین ژن شناخته شده در هموکروماتوز ارثی، دارای دو جهش بی‌معنی است. یک جهش اسید آمینهٔ سیستئین در موقعیت ۲۸۲ را به تیروزین تبدیل می‌کند (C۲۸۲ Y) و در اکثر بیماران مبتلا به هموکروماتوز مشاهده

ی کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آدرس برای مکاتبه: تهران ـ اوین ـ بیمارستان طالقانی ـ مرکز

پس از پرکردن فرم رضایت‌نامه، نمونهٔ خون جمع‌آوری و DNA ژنومیک به روش Salting out استخراج می‌شد و تحت فرآیند واکنش زنجیرهٔ پلیمراز (PCR) قرار می‌گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با Pmol ۱۲ از پرایمرهای اگزون ۲ ژن HFE برای جهش H٦٣ D (5-acatggttaaggcctattgc-3,5-gccacatctggcttaaatt-3) انجام می‌شد و PCR دیگر با Pmol ۱۲ از پرایمرهای اگزون چهار ژن HFE برای جهش C۲۸۲ Y (5-cagcccatcccctaacaaag- 3, 5-ccttcctccaacctatagaa-3) انجام می‌گردید. برای هر دو واکنش از ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۱ واحد آنزیم Taq Polymerase (Supper Taq, England)، ۰/۲mM از هر نوکلئوتید (ATP، αGTP، αCTP، αTTP) ۲mM Mgcl۲ و بافر X PCR ۱ (۵۰mM KCL، ۲۰mM Tris-Hcl، PH ۸/٤) استفاده شد. پس از دمای اولیه ۹٤̊C برای ۱ دقیقه، ۳۵ دور آمپلیفیکاسیون به وسیله ترموسایکلر پرسونال (Eppendorf, Gmbh, Hamburg, Germany) انجام شد. هر دور شامل دناتوراسیون در ۹٤̊C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۵۵̊c به مدت ۲۰ ثانیه و اکستانسیون در ۷۲̊c به مدت ٤۰ ثانیه بود. یک مرحله اکستانسیون نهایی (۷۲̊c به مدت ۱۰ دقیقه) این فرآیند را خاتمه می‌داد. برای تأیید درستی شرایط آمپلیفیکاسیون، ۵ml از هر محصول PCR که نتیجه آمپلیفیکاسیون هر اگزون HFE بود تحت الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده به وسیله اتیدیوم بروماید برای ٤۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰۰ ولت قرار گرفت. وجود نوارهای ۲۰۸ جفت باز و ٤۸٦ جفت باز (bp) به ترتیب نشانهٔ آمپلیفیکاسیون اگزون‌های H۲ و H٤ بود. برای تعیین پلی مورفیسم H۲، ۵ میکرولیتر از DNA تقویت شده به وسیله یک میکرولیتر آنزیم اندونوکلئاز محدود کنندهٔ BclI (۱۰u/µlit) و ۱µl از بافر +G که هر دو مربوط به شرکت فرمنتاس آلمان بودند، تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و به مدت ۳ ساعت در درمای ۵۵̊c انکوبه شد و نهایتاً ایجاد دو نوار ۱۳۸bp و ۷۰bp نشان دهنده آلل وحشی برای ژن HFE کدون ٦۳ بود. برای شناسایی پلی مورفیسم اگزون ٤ نیز از ۵ میکرولیتر DNA تقویت شده که تحت هضم آنزیمی به وسیله ۰/۵ میکرولیتر RsaI (۱۰u/µlit) همراه با ۱ µl بافر +Y قرار گرفت، استفاده شد. این محصول ۳ ساعت و این بار در دمای ۳۷̊c تحت انکوباسیون قرار گرفت و دو نوار ۲۹۳ bp و ۱۹۳ bp به عنوان آلل نوع وحشی برای

فراوانی جهش‌های HFE بین جمعیت طبیعی و بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی وجود ندارد (۲). تاکنون تنها یک مطالعه نقش جهش HFE در هپاتیت خود ایمنی را بررسی کرده است. این مطالعه نشان داده است که اختلاف قابل توجهی در شیوع جهش C۲۸۲ Y در بیماران مبتلا به بیماری‌های مختلف کبدی وجود دارد و بیشترین میزان فراوانی نیز در هپاتیت خود ایمنی و سیروز صفراوی اولیه دیده شده است (۷). البته جهش C۲۸۲ Y به تنهایی فقط افزایش مختصری در تجمع آهن در اکثر این بیماران ایجاد کرده بود به جز در مورد هتروزیگوت‌های ترکیبی C۲۸۲ Y / H٦٣ D که در آنها شاخص‌های آهن افزایش یافته بودند (۷). همچنین این احتمال وجود دارد که تأثیر جهش HFE بر پیشرفت یا تکامل بیماری کبدی مستقل از اثر آن بر تجمع آهن باشد (٤). این موضوع ممکن است تا حدی مربوط به شباهت بین پروتئین HFE و MHC طبقه ۱ باشد و همچنین یک فرضیهٔ قوی مبنی بر نقش احتمالی پروتئین HFE در سیستم ایمنی بدن وجود دارد. لذا این تحقیق به منظور تعیین فراوانی جهش‌های ژن HFE در بیماران هپاتیت خود ایمنی و تعیین رابطه احتمالی این جهش‌های با وراثت مغلوب بر سطح فریتین برروی مراجعین مرکز تحقیقات گوارش و کبد در سال ۱۳۸۲ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش مورد ـ شاهدی در ٦٦ بیمار ایرانی مبتلا به هپاتیت خود ایمنی که به طور مستمر به درمانگاه سرپایی بیماری‌های کبدی مراجعه کرده بودند، انجام شد. تمام بیماران معیارهای تشخیصی گروه بین‌المللی هپاتیت خود ایمنی (IAHG) جهت تشخیص را برآورده می‌کردند.

همچنین تمامی بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی (AIH) از نظر سرولوژی عفونت با ویروس هپاتیت B و C، با استفاده از نسل دوم آزمون، منفی بودند. بیماران با علل ثانویه افزایش آهن نیز از مطالعه حذف شدند. جمعیت شاهد سالم شامل ۱۲۰ فرد ایرانی از اهداکنندگان خون سالم و کارکنان آزمایشگاه بودند که از نظر سن و جنس با گروه شاهد همسان بودند. در گروه شاهد آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B و آنتی‌بادی ضد HCV منفی بودند و آزمون‌های کارکرد کبدی آنها در محدودهٔ طبیعی قرار داشت.

این جهش (H٦٣D) هموزیگوت بودند. فراوانی آلل برای جهش D H٦٣ به ترتیب ١٣/٦ و ١٢/٥در بیماران و گروه شاهد بود. از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در تعداد جهش‌هایH٦٣D بین دو گروه وجود نداشت (p<٠/٩).

جدول ۱- فراوانی جهش‌های ژن *HFE* در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی و گروه شاهد

وضعیت جهش‌ها	گروه شاهد(n=١٢)	گروه بیمار(n=٦٦)
H٦٣D /WT	(٪٧/٢١)٢٦	(٪٢/٢١)١٤
H٦٣ D/H٦٣D	(٪٧/١)٢	(٪٣)٢
WT/WT	(٪٦/٧٦)٩٢	(٪/٧٥)٥٠
C٢٨٢ Y و C٢٨٢ Y	"	"
C٢٨٢ Y و H٦٣ D	"	"
C٢٨٢ Y /WT	"	"

WT : وحشی

سطح سرمی فـــریتین در بیماران با و بدون جهش H٦٣D در جدول ٢ ارایه شده است. میزان آنها به ترتیب ١١٥/٦±٢٢٧/٩g/ml و ٧٩/٦±١٠٧/١ng/ml به دست آمد. با وجود این که بیماران دارای جهش در مقایسه با بیماران بدون آن سطح بالاتری از فریتین داشتند، هر دو گروه در محدوده طبیعی قرار می‌گرفتند (زنان در محدودهٔ ٥/١-١٠٣ زنان و مردان در محدودهٔ ٣٠٦ -١٥/٣). در ٤ زن و دو مرد در گروه بیماران که از نظر جهشH٦٣ D ژنوتیپ Wild/Wild (بدون جهش) داشتند سطح سرمی فریتین بالا گزارش شد. در ضمن، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین سطح فریتین در بیماران دارای جهشH٦٣ D و بیماران بدون این جهش دیده نشد. در بین ٦٦ بیمار ارزیابی شده، ٨ بیمار سطح فریتین سرمی بالایی داشتند که دو نفر از آنها برای جهش H٦٣D هتروزیگوت بودند. دو بیمار هموزیگوت از نظر این جهش سطوح سرمی فریتین طبیعی داشتند. سطح سرمی فریتین در تمام هتروزیگوت‌ها و دو فرد هموزیگوت گروه شاهد نیز طبیعی گزارش شد.

جدول ۲- میزان فریتین سرم بر حسب وضعیت جهش در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی

وضعیت جهش‌ها	فریتین سرم
H٦٣D /WT	١٣٠ ±٦/٢٤٤(N=١٤)

کدون ٢٨٢ ژن HFE (اگزون ٤) در نظر گرفته شد. در ضمن، از الکتروفورز در ژل اکریل آمید ١٠ درصد برای جدا کردن قطعات استفاده شد.

برای ژن HFE، نوارهای ١٣٨bp و ٧٠bp پس از هضم آنزیمی نشانهٔ آلل وحشی بودند که با داشتن محل هضم برای BclI مشخص می‌شدند. وجود یک نوار به تنهایی در ناحیهٔ ٢٠٨bp نشان دهنده آلل جهش یافته هموزیگوت بود که ناحیه هضم آنزیم را نداشت و آلل‌های هتروزیگوت با وجود نوار در نواحی ٢٠٨bp، ١٣٨bp و bp ٧٠ مشخص می‌شدند.

پلی‌مورفیسم در کدون ٢٨٢ پس از هضم به وسیله RsaI از طریق وجود یا عدم وجود نوار در نواحی ١٩٣bp و ١٦٤bp تشخیص داده می‌شود. برای این کدون، آلل جهش یافته دارای دو ناحیه هضم توسط RsaI (GTAC) است که باعث شکسته شدن محصول PCR به قطعات ٢٩٣bp، ١٦٤ bp و ٢٩bp می‌گردد، در حالی که آلل نوع وحشی یکی از این نواحی هضم را ندارد. بنابراین با نوارهای ١٩٣bp و ٢٩٣bp مشـخص می‌شود. همـوزیگوت بودن برای تیروزین در کدون ٢٨٢ توسط وجود نوارهای ٢٩٣bp و ١٦٤bp تشخیص داده می‌شود (معمولاً نوار ٢٩bp دیده نمی‌شود) در حالی که وجود سه نوار ٢٩٣bp، ١٩٣bp و ١٦٤bp نشان دهنده هتروزیگوت بودن هستند. میزان آهن سرم به روش ایمونورادیومتریک اندازه‌گیری شد. (Ferritin, IRMA, The Orion Diagnostica SPECTRIA, Finland) اطلاعات به دست آمده به وسیله SPSS نسخه یازدهم مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. از آزمون مجذور کای برای یافتن تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها یا زیر گروه‌های مطالعه استفاده شد.

یافته‌ها

بیماران یا گروه مورد شامل ٦٦ نفر (٪٧٢ زن و ٪٢٨ مرد) در محدوده سنی ٦٩-١٧ سال بودند. جمعیت شاهد شامل ١٢٠نفر (٪٦٤زن و ٪٣٦ مرد) در محدوده ٥٨-١٦سال بودند. به این ترتیب گروه‌های مورد و شاهد به لحاظ سن و جنس و وضعیت اقتصادی ـ اجتماعی (از نظر مراجعین به یک مرکز) مشابه بودند.

در جدول ١ نتایج تجزیه جهش‌های H٦٣D و C٢٨٢Y در گروه بیماران دچار هپاتیت خود ایمنی و گروه شاهد آنها ارایه شده است. این جدول نشان می‌دهد که جهش C٢٨٢Y در گروه شاهد و بیماران دیده نشده است. چهارده بیمار (٪٢١/٢) و ٢٦ شاهد (٪٢١/٧) از نظر H٦٣D هتروزیگوت بودند. دو بیمار (٪٣) و ٢ شاهد (٪١/٧) برای

شاهد، تمام هتروزیگوت‌ها و افراد هموزیگوت سطح فریتین طبیعی داشتند. در گروه بیماران نیز هر دو فرد هموزیگوت سطح فریتین طبیعی داشتند اما در بین ١٤ بیمار هتروزیگوت دو نفر سطح فریتین بالایی نشان دادند. یکی از آنها زن ۳۲ ساله با فریتین ۷۱۵/۱ng/ml و دیگری مرد ٤٠ ساله‌ای با فریتین ۵۸۱ng/ml بودند.

در ٤ زن و دو مرد در گروه بیماران که از نظر جهش H٦٣D ژنوتیپ Wild/Wild (بدون جهش) داشتند، سطح سرمی فریتین بالا گزارش شد. تفاوت قابل توجه آماری در سطح فریتین بین بیماران دارای جهش H٦٣D و بیماران بدون آن وجود نداشت. این موضوع نشان می‌دهد که نقش جهش H٦٣D در افزایش سطح فریتین در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی برجسته نیست. از طرفی چون بیماران دارای وضعیت‌های مرتبط با اضافه بار ثانویه آهن از این مطالعه حذف شدند، دلیل نتایج فریتین غیرطبیعی در این بیماران مشخص نیست. در یک مطالعه بزرگ در فرانسه در مورد بیماران دارای اضافه بار آهن، ژنوتیپ‌های HFE بر بروز اضافه بار آهن در افراد غیر هموزیگوت از نظر C٢٨٢Y اثر بسیار کمی داشتند (۸).

به طور خلاصه می‌توان گفت که با وجود دیده شدن تغییرات سطح فریتین در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی، نمی‌توان ارتباط بین آن و هتروزیگوت بودن از نظر ژن HFE را نشان داد. در ضمن، هتروزیگوت بودن از نظر ژن HFE را نباید به عنوان عامل افزایش استعداد ابتلا به هپاتیت خود ایمنی در بیماران ایرانی در نظر گرفت. نهایتاً ما به تحقیقات بیشتری در مورد ژن‌های مؤثر بر عملکرد سیستم ایمنی نیازمندیم تا عوامل ژنتیکی مستعد کننده ابتلا به هپاتیت خود ایمنی را مشخص کنیم.

H٦٣ D/H٦٣D	٦/٢٩ ±٩/٦(N=٢)
WT/WT	٦/٧٩±١/١٠٧(N=٥٠)
C٢٨٢Y و C٢٨٢Y	"
H٦٣D و C٢٨٢Y	"
C٢٨٢Y /WT	"

WT : وحشی

بحث

این تحقیق نشان داد که بیماران ما از نظر جهش C٢٨٢Y، که به عنوان یک مولکول MHC-I ممکن است بر دوره بیماری هپاتیت خود ایمنی و تعادل آهن اثر بگذارد، هموزیگوت نیستند. یافتهٔ حاضر در تقابل با یافتهٔ هولر و همکاران است که نشان دادند اختلاف زیادی در شیوع جهشC٢٨٢Y در افراد دارای شکل‌های مختلف بیماری‌های کبدی وجود دارد که بالاترین حد این شیوع (۱۷/۲٪) در بیماری هپاتیت خود ایمنی است (۷). این مسأله ممکن است یا به دلیل معیارهای انتخاب بیماران در مطالعه حاضر باشد که بیماران دارای اضافه بار آهن در محدودهٔ هموکروماتوز را از مطالعه حذف می‌کرد و یا به دلیل نژاد ایرانی باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین اختلاف معنی‌داری در فراوانی جهش H٦٣D در بیماران مبتلا به هپاتیت خود ایمنی و گروه شاهد پیدا نکردیم که نشان می‌دهد این نوع جهش در بیماران مبتلا به هپاتیت خودایمنی نقش چندانی ایفا نمی‌کند.

سطح سرمی فریتین در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد بالاتر بود اما تفاوت معنی‌دار آماری بین این دو گروه وجود نداشت. در گروه

REFERENCES

1. Zakim D, Boyer TD.Hepatology, 4th ed. Saunders Co.; 2002; p: 1163.

2. Piperno A, Vergani A, Malosio I. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE mutations. Hepatology 1998;28:1105-9.

3. Worwood M. HFE mutations as risk factors in disease. Best Pract Res Clin Hematol 2002;15(2):295-314

4. Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. J Hepatol 2002; 37:848-854

5. Thorburn D, Curry G, Spooner R. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. GUT 2002; 50: 248-52.

6. Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 1999;116:127-34.

7. Hohler T, Leininger S, Kohler HH, Schirmacher P, Galle PR. Heterozygosity for the hemochromatosis gene in liver diseases--prevalence and effects on liver histology.Liver 2000;20(6):482-6.

8. Moirand R, Jouanolle A M, Brissot P, Le Gall J Y, David V, Deugnier Y. Phenotypic expression of HFE mutations: a French study of 1110 unrelated iron overloaded patients and relatives. Gastroentrology 1999; 116: 372-7.