

پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۳۰

سال ۱۰، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۸۴، صفحات ۲۳۱ تا ۲۳۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۶/۲۵

بررسی رابطه جهش‌های ژن HFE با بیماری هپاتیت خود ایمنی

دکتر ممدرضا آگاه^{*}، دکتر مسین سندی^۱، دکتر مریم ظفرقندی^۱، دکتر طاهره غازیانی^۱، دکتر آرتا آریایاد^۱، دکتر آزیتا حکمت دوست^۱، دکتر ممدرضا زالی^۲

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 H6۳D 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 - 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 H6۳D و C۲۸۲Y در تمام افراد تحت مطالعه به وسیله هضم آنزیمی محصولات واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) به ترتیب از طریق اندونوکلازهای محدود کننده 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 H6۳D 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 ($p < ۰/۰۹$). اختلاف معنی‌داری از نظر سطح فریتین بین بیماران دارای جهش H6۳D و بیماران فاقد آن دیده نشد.

نتیجه‌گیری: جهش‌های H6۳D 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

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 جانبه 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 آمینه سیستمین در موقعیت ۲۸۲ را به تیروزین تبدیل می‌کند (C۲۸۲Y) و در اکثر بیماران مبتلا به هموکروماتوز مشاهده

می‌شود. جهش دوم هیستیدین موقعیت ۶۳ را به اسید آسپارتیک تبدیل می‌کند (H6۳D) اما نقش آن در هموکروماتوز مورد بحث است (۲). پنج تا ۱۵ درصد جمعیت برای C۲۸۲Y هتروزیگوت هستند و ۱۵-۲۵ درصد نیز ناقل H6۳D و C۲۸۲Y محسوب می‌شوند (۳).

بعضی مطالعات افزایش فراوانی جهش C۲۸۲Y را در بین بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی در مقایسه با جمعیت گزارش کرده‌اند (۴، ۵، ۶) در حالی که مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تفاوتی از نظر

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 C2۸۲ 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 C2۸۲ Y به تنهایی فقط افزایش مختصری در تجمع آهن در اکثر این بیماران ایجاد کرده بود به جز در مورد هتروزیگوت‌های ترکیبی C2۸۲ Y / H۶۳ 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 (۴). این موضوع ممکن است تا حدی مربوط به شباهت بین پروتئین HFE و MHC طبقه ۱ باشد و همچنین یک فرضیه 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 بروی مراجعین مرکز تحقیقات گوارش و کبد در سال ۱۳۸۲ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش مورد - شاهدهی در ۶۶ 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 محدوده طبیعی قرار داشت.

پس از پرکردن فرم رضایت‌نامه، نمونه خون جمع‌آوری و DNA ژنومیک به روش Salting out استخراج می‌شد و تحت فرآیند واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) قرار می‌گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با Pmol ۱۲ از پرایمرهای اگزون ۲ ژن HFE برای جهش H^{۶۳} D (5-acatggttaaggcctattgc-3,5-gccacatctggcttaaat-3) انجام می‌شد و PCR دیگر با Pmol ۱۲ از پرایمرهای اگزون چهار ژن HFE برای جهش C^{۲۸۲} Y (5-cagcccatccccaacaaag- C^{۲۸۲} Y 3, 5-ccttctccaacctatagaa-3) انجام می‌گردید. برای هر دو واکنش از ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۱ واحد آنزیم Taq Polymerase (Supper Taq, England)، ۰/۲mM از هر نوکلئوتید (αTTP, αCTP, αGTP, ATP) و MgCl_۲ ۲mM و بافر X PCR (۲۰mM Tris-HCl, ۵۰mM KCL, PH ۸/۴) استفاده شد. پس از دمای اولیه ۹۴°C برای ۱ دقیقه، ۳۵ دور آمپلیفیکاسیون به وسیله ترموسایکلر پرسونال (Eppendorf, GmbH, Hamburg, Germany) انجام شد. هر دور شامل دناتوراسیون در ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۵۵°C به مدت ۲۰ ثانیه و اکستنسین در ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه بود. یک مرحله اکستنسین نهایی (۷۲°C 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 ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۰۰ ولت قرار گرفت. وجود نوارهای ۲۰۸ جفت باز و ۴۸۶ جفت باز (bp) به ترتیب نشان‌دهنده آمپلیفیکاسیون اگزون‌های H_۲ و H_۴ بود. برای تعیین پلی مورفیسم H_۲، ۵ میکرولیتر از DNA تقویت شده به وسیله یک میکرولیتر آنزیم اندونوکلاز محدود کننده BclII (۱۰۰/μlit) و ۱ μl از بافر G+ که هر دو مربوط به شرکت فرمنتاس آلمان بودند، تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵°C انکوبه شد و نهایتاً ایجاد دو نوار ۱۳۸bp و ۷۰bp نشان دهنده آلل وحشی برای ژن HFE کدون ۶۳ بود. برای شناسایی پلی مورفیسم اگزون ۴ نیز از ۵ میکرولیتر DNA تقویت شده که تحت هضم آنزیمی به وسیله ۰/۵ میکرولیتر RsaI (۱۰۰/μlit) همراه با ۱ μl بافر Y+ قرار گرفت، استفاده شد. این محصول ۳ ساعت و این بار در دمای ۳۷°C تحت انکوباسیون قرار گرفت و دو نوار ۲۹۳ bp و ۱۹۳ bp به عنوان آلل نوع وحشی برای

کدون ۲۸۲ ژن HFE (اگزون ۴) در نظر گرفته شد. در ضمن، از الکتروفورز در ژل اکریل امید ۱۰ درصد برای جدا کردن قطعات استفاده شد.

برای ژن HFE، نوارهای ۱۳۸bp و ۷۰bp پس از هضم آنزیمی نشانۀ آلل وحشی بودند که با داشتن محل هضم برای BclII مشخص می شدند. وجود یک نوار به تنهایی در ناحیۀ ۲۰۸bp نشان دهنده آلل جهش یافته هموزیگوت بود که ناحیه هضم آنزیم را نداشت و آلل های هتروزیگوت با وجود نوار در نواحی ۲۰۸bp، ۱۳۸bp و ۷۰bp مشخص می شدند.

پلی مورفیسم در کدون ۲۸۲ پس از هضم به وسیله RsaI از طریق وجود یا عدم وجود نوار در نواحی ۱۹۳bp و ۱۶۴bp تشخیص داده می شود. برای این کدون، آلل جهش یافته دارای دو ناحیه هضم توسط RsaI (GTAC) است که باعث شکسته شدن محصول PCR به قطعات ۲۹۳bp، ۱۶۴bp و ۲۹bp می گردد، در حالی که آلل نوع وحشی یکی از این نواحی هضم را ندارد. بنابراین با نوارهای ۱۹۳bp و ۲۹۳bp مشخص می شود. هموزیگوت بودن برای تیروزین در کدون ۲۸۲ توسط وجود نوارهای ۲۹۳bp و ۱۶۴bp تشخیص داده می شود (معمولاً نوار ۲۹bp دیده نمی شود) در حالی که وجود سه نوار ۲۹۳bp، ۱۹۳bp و ۱۶۴bp نشان دهنده هتروزیگوت بودن هستند. میزان آهن سرم به روش ایمونورادیومتریک اندازه گیری 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 معنی دار بین گروه ها یا زیر گروه های مطالعه استفاده شد.

یافته ها

بیماران یا گروه مورد شامل ۶۶ نفر (۷۲٪ زن و ۲۸٪ مرد) در محدوده سنی ۱۷-۶۹ سال بودند. جمعیت شاهد شامل ۱۲۰ نفر (۶۴٪ زن و ۳۶٪ مرد) در محدوده ۱۶-۵۸ سال بودند. به این ترتیب گروه های مورد و شاهد به لحاظ سن و جنس و وضعیت اقتصادی - اجتماعی (از نظر مراجعین به یک مرکز) مشابه بودند.

در جدول ۱ نتایج تجزیه جهش های H₆₃D و C₂₈₂Y در گروه بیماران دچار هپاتیت خود ایمنی و گروه شاهد آنها ارائه شده است. این جدول نشان می دهد که جهش C₂₈₂Y در گروه شاهد و بیماران دیده نشده است. چهارده بیمار (۲۱/۲٪) و ۲۶ شاهد (۲۱/۷٪) از نظر H₆₃D هتروزیگوت بودند. دو بیمار (۳٪) و ۲ شاهد (۱/۷٪) برای

این جهش (H₆₃D) هموزیگوت بودند. فراوانی آلل برای جهش D H₆₃ به ترتیب ۱۳/۶ و ۱۲/۵ در بیماران و گروه شاهد بود. از نظر آماری تفاوت معنی داری در تعداد جهش های H₆₃D بین دو گروه وجود نداشت (p < ۰/۰۹).

جدول ۱- فراوانی جهش های ژن HFE در بیماران مبتلا به هپاتیت

نوع ایمنی و گروه شاهد		
وضعیت جهش ها	گروه شاهد (n=۱۲)	گروه بیمار (n=۶۶)
H ₆₃ D / WT	۲۶ (۷/۲۱٪)	۱۴ (۲/۲۱٪)
H ₆₃ D/H ₆₃ D	۲ (۷/۱٪)	۲ (۳٪)
WT/WT	۹۲ (۶/۷۶٪)	۵۰ (۷/۵۰٪)
C ₂₈₂ Y و C ₂₈₂ Y	"	"
C ₂₈₂ Y و H ₆₃ D	"	"
C ₂₈₂ Y /WT	"	"

WT: وحشی

سطح سرمی فریتین در بیماران با و بدون جهش H₆₃D در جدول ۲ ارائه شده است. میزان آنها به ترتیب ۱۱۵/۶±۲۲۷/۹g/ml و ۷۹/۶±۱۰۷/۱ng/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 می گرفتند (زنان در محدوده ۱۰۳-۵/۱ و مردان در محدوده ۳۰۶-۱۵/۳). در ۴ زن و دو مرد در گروه بیماران که از نظر جهش H₆₃ D ژنوتیپ Wild/Wild (بدون جهش) داشتند سطح سرمی فریتین بالا گزارش شد. در ضمن، اختلاف معنی داری از نظر آماری بین سطح فریتین در بیماران دارای جهش H₆₃ D و بیماران بدون این جهش دیده نشد. در بین ۶۶ بیمار ارزیابی شده، ۸ بیمار سطح فریتین سرمی بالایی داشتند که دو نفر از آنها برای جهش H₆₃D هتروزیگوت بودند. دو بیمار هموزیگوت از نظر این جهش سطوح سرمی فریتین طبیعی داشتند. سطح سرمی فریتین در تمام هتروزیگوت ها 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 جهش ها	فریتین سرم
H ₆₃ D /WT	۱۳۰ ± ۶۷۲۴۴ (N=۱۴)

$6/29 \pm 9/6 (N=2)$	H63D/H63D
$6/79 \pm 1/107 (N=50)$	WT/WT
"	C282Y و C282Y
"	C282Y و H63D
"	C282Y /WT

WT: وحشی

بحث

این تحقیق نشان داد که بیماران ما از نظر جهش C282Y، که به عنوان یک مولکول MHC-I ممکن است بر دوره بیماری هپاتیت خود ایمنی و تعادل آهن اثر بگذارد، هموزیگوت نیستند. یافته حاضر در تقابل با یافته هولر و همکاران است که نشان دادند اختلاف زیادی در شیوع جهش C282Y 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 محدوده 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 H63D 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

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 ۱۴ بیمار هتروزیگوت دو نفر سطح فریتین بالای نشان دادند. یکی از آنها زن ۳۲ ساله با فریتین ۷۱۵/۱ ng/ml و دیگری مرد ۴۰ ساله‌ای با فریتین ۵۸۱ ng/ml بودند.

در ۴ زن و دو مرد در گروه بیماران که از نظر جهش H63D ژنوتیپ Wild/Wild (بدون جهش) داشتند، سطح سرمی فریتین بالا گزارش شد. تفاوت قابل توجه آماری در سطح فریتین بین بیماران دارای جهش H63D و بیماران بدون آن وجود نداشت. این موضوع نشان می‌دهد که نقش جهش H63D 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 C282Y 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.

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. *Gastroentology* 1999; 116: 372-7.