

## دراسة تموضع الحواتم وتحت أصناف النمط الأسوي IgG لأضداد العامل الثامن لدى مرضى الناعور A

الدكتورة تهاني علي\*

### الملخص

خلفية البحث وهدفه: إن تشكيل المثبّطات (أضداد ضد العامل الثامن ant-FVIII) هو حالياً أحد الاختلالات الكبرى لعلاج مرضى الناعور A، العلاج الوحيد الفعال عند ظهورها هو إحداث التحمل المناعي ITI ولا يوجد إلى يومنا هذا أيّ عامل مخبري منبئ بالاستجابة لهذا العلاج المقلق والباهظ التكلفة.

هدف هذا البحث إلى دراسة الرد المناعي ضد العامل الثامن لدى مرضى الناعور A عبر تموضع الحواتم Epitope mapping وتحديد تحت الأصناف للنمط الإسوي G (IgG subclasses) لمثبّطات العامل الثامن anti-FVIII .

مواد البحث وطرائقه: أجري هذا البحث في المركز الوطني للبحث العلمي بكلية الطب بجامعة مونبلييه في فرنسا في عام 2010-2011، وذلك باستخدام تقنية x-MAP وجهاز BioPlex على عينات بلازما أخذت من 26 مريض ناعور A لديهم مثبّطات: 73% منهم من النمط الشديد، و27% من النمط متوسط الشدة.

النتائج: كان متوسط عيار المثبّطات: 4.8، 0.9 وحدة بيتيزدا/مل لدى مرضى النمط الشديد، والنمط المتوسط، على التوالي ومتوسط العمر 20، 8 سنة على التوالي. و57.7% من الأضداد كانت تجاه السلسلة الثقيلة HC و76% تجاه السلسلة الخفيفة LC وموجهة تحديداً إلى الحاتمة C2 لدى 61.5% والحاتمة A2 لدى 53.8%. سيطر تحت النمط IgG1, IgG3 تجاه المنطقة HC, A2 في حين كان IgG2, IgG4 مسيطراً تجاه المنطقة LC, C2 من العامل الثامن.

الاستنتاج: يمكن لدراسة تموضع الحواتم للمثبّطات لدى مرضى الناعور باستخدام تقنية (x-MAP) أن يساعد على معرفة الحواتم المستهدفة وتحديد تحت صنف الأضداد مما سيكون له دور كبير في توقّع مدى استجابة المريض للعلاج بإحداث التحمل المناعي وتوقّع الزمن اللازم لإختفاء المثبّطات، ومن ثمّ سيكون مهماً توقّع النكس، كما يمكن أن يساعد على تطوير استراتيجيات وقائية وعلاجية لهؤلاء المرضى، وقد يجنب الحاجة لاستخدام عامل التجاوز المكلف جداً وترشيد تطبيق العلاج بإحداث التحمل المناعي ITI.

\* أستاذ مساعد - قسم الطب المخبري - كلية الطب البشري - جامعة دمشق.

## Study of the Epitope Mapping and Igg Sub-Classes of Anti-Factor VIII Antibodies in Patients with Haemophilia A

Tahani ALI\*

---

### Abstract

**Background& Objective:** The development of inhibitors (Antibody against factor VIII ant-FVIII) is currently one of the major complications for the treatment of patients with hemophilia A, The only effective treatment available today when they appear is Immune Tolerance Induction ITI, There is no to the present any laboratory predictor of response to this worrying and expensive treatment.

This research aims to study the epitope mapping and identification of IgG sub-classes of factor FVIII inhibitors to study the immune response against factor VIII in patients with hemophilia A.

**Materials & Methods:** This research was conducted at the National Center for Scientific Research, Faculty of Medicine, University of Montpellier in France in 2010-2011, using the x-MAP technology and a BioPlex to analyze plasma samples taken from 26 hemophilia A patients with inhibitors: 73%, 27% had severe, moderate phenotype respectively.

**Results:** The median titer of inhibitors was: 4.8 Bethesda unit / ml, 0.9 Bethesda unit / ml respectively and the median age was: 20 years, 8 years, respectively. 57.7% of antibodies was directed against the heavy chain (HC) and 76% towards the light chain (LC) and targeted specifically to the C2 epitope in 61.5% and to A2 epitope in 53.8%.

Our data suggested the dominance of IgG1, IgG3 directed again HC, A2 while IgG2, IgG4 was dominant towards the region LC, C2 of factor VIII.

**Conclusion:** Study of the epitope mapping of inhibitors using x-MAP technology in hemophilia A patients can help to know the epitopes targeted and determine sub-classes of anti-FVIII which will have a significant role in predicting patient response to immune tolerance Induction and expected time required for the disappearance of inhibitors and thus will be an important sign of relapse , can also help in the development of preventive and treatment strategies for these patients and may avoid the need to use the very expensive treatment by passing agent and the rationalization of the application of immune tolerance Induction ITI.

---

---

\* Aide Professeur-département de biologie médicale--faculté de médecine -université de Damas

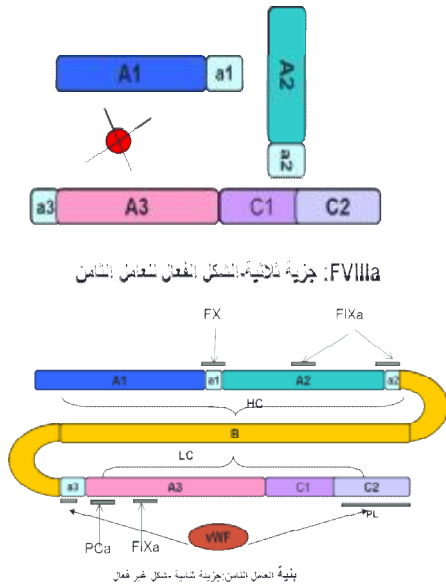
## مقدمة:

لا يوجد إلى يومنا هذا أي عامل مخبري منبئ بالاستجابة لهذا العلاج المفلق والباهظ التكلفة، ولا أي مشعر يمكنه أن يوجّه لاختيار العامل الثامن العلاجي المثالي للمريض<sup>10,9</sup>.

يتألف العامل الثامن الجائل في الدوران من مجالات عدة تتضمّن في جزيئة ثلاثية فعالة من سلسلتين: ثقيلة HC تتألف من المناطق A1-a1-A2-a2 ، وخفيفة LC تتألف من المناطق: a3-A3-C1-C2.

متبّطات العامل الثامن هي أضداد عديدة النسيلة تضم غلوبولينات مناعية من النمط الأسيوي G التي تحيّد الفعالية المحفّزة للتخثر للعامل الثامن عبر تعطيل ارتباطه ببعض شركائه من شلال التخثر مثل عامل فون ويلبراند (VWF)، والفسفوليبيدات (PLs) ، والعامل التاسع (FIX) والعامل العاشر (FX)<sup>12,11</sup>.

تتوضّع الحواتم التي يجري العمل عليها من قبل المتبّطات غالباً على مستوى المجالات A2 و/أو C2 للعامل الثامن<sup>13</sup> (شكل 1).



مرض الناعور A هو اضطراب نزفي وراثي مرتبط بالصبغي X، ينجم عن نقص أو خلل وظيفي لعامل تخثر الدم البشري الثامن VIII (FVIII)، يبلغ معدل الإصابة به 10000/1 من المواطنين وبغضّ النظر عن العرق، يصيب الذكور فقط، أمّا النساء فيكنّ ناقلات للمرض<sup>1</sup>.

قد تحدث الإصابة بالناعور A بشكل مكتسب في حالات نادرة جداً (1-3 /المليون/السنة)، وهذا يمكن أن يحدث لدى الجنسين<sup>3,2</sup>.

يعتمد العلاج لدى مرضى الناعور على تعويض العامل الثامن الناقص بشكل وقائي أو عند الحاجة.

يختلط العلاج لدى نحو 25% من المصابين بالشكل الشديد للناعور (عامل ثامن >1%) بتطوير أضداد متبّطة تجاه العامل الثامن المسرّب<sup>1</sup>.

إنّ تشكيل المتبّطات (أضداد ضد العامل الثامن anti-FVIII) هو حالياً أحد الاختلاطات الكبرى لعلاج مرضى الناعور A، تطوير المتبّطات يجعل المرضى غير مستجيبين للعلاج المعوض بالعامل الثامن لذا يجب أن تعالج النزوف الحادّة بعوامل تتجاوز العامل الثامن، مثل العامل السابع المفعّل المؤشّب (FVIIa) أو ركازة مركّب البروترومبين المفعّل<sup>4,1</sup>.

تهدف الإستراتيجية المفضّلة لعلاج مرضى الناعور A الذين لديهم متبّطات للتخلّص من المتبّطات عبر تحييدها عن طريق إعطاء وريدي متكرّر لجرعات عالية جداً من ركازة العامل الثامن، وهو يسمّى العلاج بإحداث التحمّل المناعي (ITI) الذي يؤدي عموماً إلى انخفاض تدريجي في عيار المتبّطات<sup>5,1,2</sup>، يراوح معدل نجاح إحداث التحمّل المناعي بين 70-80%، وتتأثر نتائجه بعيار المتبّطات عند بدء العلاج، وتاريخ عيار الذروة وعيار الذروة خلال العلاج<sup>8,7,6</sup>.

العامل الثامن anti-FVIII في مراحل العلاج كلها وتقتصر واسماً منبئاً بفعالية العلاج أو إخفاقه بإحداث التحمل المناعي انطلاقاً من التقصي المستقبلي لبروفيل حواتم المثبتات<sup>10</sup>.

#### الطريقة المفضلة لموضعة الحواتم Epitope Mapping :

موضعة الحواتم هي تحديد الحواتم المعروفة من قبل المثبتات، توجد تقنيات مختلفة لتحليل موضعة حواتم المثبتات (إليزا Elisa، تقنية x-MAP) التي لها خصائص مختلفة وبعض السلبيات المعروفة للاستخدام في البحث الروتيني<sup>18</sup>:

1-تقنية الإليزا هي تقنية حساسة نوعية وموحدة، ومع ذلك تبقى صعبة التطبيق لموضعة الحواتم لأنها تحتاج كمية كبيرة من البلازما لدراسة الرد المناعي على مستوى السلسلتين الثقيلة والخفيفة للعامل الثامن ومستوى الأصناف وتحت الأصناف لل IgG. لذا لا يوصى بهذه الطريقة للعمل المخبري الروتيني من أجل موضعة حواتم أضداد العامل الثامن.

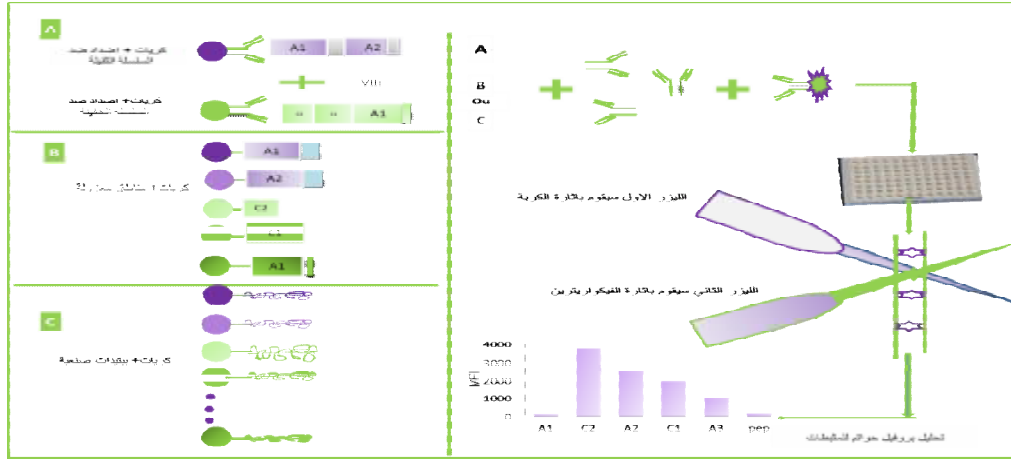
2-تقنية x-MAP (x : سطح متعدد الحلائل) من Luminex<sup>TM</sup> هي تقنية تعتمد على مبدأ الإليزا لكن تملك ميزات عديدة فهي تسمح بتحليل متران لعدة حلائل (حتى 100 تحليل) للعينة نفسها، هذا التعدد يمثل توفيراً حقيقياً للوقت (3-4 ساعات) مقارنة بالإليزا بالمرحلة الصلبة، وبشكل خاص يسمح بإنفاص كمية البلازما المستعملة (أقل من 100 ميكروليتر لفحص الحليات المطلوبة كلها). يركز الاختبار على استعمال كريات من البوليسثيرين، يحمل كل منها علامة وحيدة، مقرونة بواسم متألّق بحسب نوعية الحاتمة المبحوث عنها (anti-LC، anti-A2، anti-C2، anti-HC) لأضداد العامل الثامن. تكون الكريات مقرونة بأضداد anti-LC / anti-HC أو مقرونة مباشرة بالمجالات C2 / A2 للعامل الثامن وتوضع فيما بعد

تتكوّن مثبّطات العامل الثامن من مجموعة عديدة النسيطة من الأضداد التي تستهدف مواقع مستضدية متعدّدة في المجال A2,A3 و C2 من العامل الثامن<sup>1</sup>. يظهر تحليل تحت الأصناف باللّوحة المناعية والمقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA) أنّ مثبّطات العامل الثامن تشمل تحت أصناف IgG1,IgG2,IgG3 و IgG4<sup>14,11</sup>؛ ممّا يدعو للاهتمام بملاحظة وجود مستوى عالٍ نسبياً من تحت الصنف IgG4 من أضداد العامل الثامن لدى المرضى الذين لديهم مثبّطات بعيار عالٍ<sup>15</sup>.

من المهم دراسة تحت أصناف المثبتات بهدف الوصول إلى فهم أفضل للآليات الفيزيولوجية المرضية المؤدية إلى ظهورها، أو المفسرة لطريقة عملها<sup>16</sup>.

في عام 2008، سمح تحليل الرد المناعي ضد العامل الثامن لمرضى الناعور A إيجابيين المثبتات عولجوا بإحداث التحمل المناعي بتحديد عاملين محددين للإنذار ودورها في مصير العلاج بإحداث التحمل المناعي؛ وذلك باستخدام تقنية الإليزا: العامل الأول يعتمد على فرضية أنّ نوعية الحواتم لأضداد العامل الثامن يمكن أن تكون عاملاً محدداً لفعالية العلاج أو إخفاقه، أظهر Greninger وزملاؤه نسبة إخفاق 75% عند المرضى الذين لديهم مثبّط من نوعية ضد المجال A2<sup>17</sup>، والعامل الثاني يعتمد على افتراض أنّ تطوّر تحت الأصناف IgG مع الوقت سيكون منبئاً عن نتيجة العلاج بإحداث التحمل المناعي: لاحظ Van Helden أنّ رداً مناعياً من تحت الصنف IgG4 كان موجوداً لدى المرضى ذوي العيار المرتفع أكثر للمثبّطات و أنّ السياق المناعي و/أو كثافة العلاج يمكن أن تزيد من تغيّر صنف الأضداد ضد العامل الثامن نحو النمط IgG4 ذي الإنذار السيئ لنتيجة العلاج بإحداث التحمل المناعي<sup>18</sup>. هذه النتائج تؤكّد فائدة تطوير وسائل تشخيصية جديدة تسمح بدراسة الرد المناعي ضد

بتماس مع بلازما المرضى. يستعمل ضد آخر بشري anti-IgG موسوم بالفيكواريترين phycoerythrin لإظهار وجود IgG الكلية، IgG2, IgG3 و/أو IgG4 عند المريض، ويعبر عن النتائج بشدة الومضان<sup>19</sup>.



شكل رقم 2: تقنية x-MAP المتلائمة مع البحث عن أضداد العامل الثامن: تسمح هذه التقنية بإجراء إما وسم مزدوج duplexage لكريات مقرونة بأضداد ضد السلسلة الثقيلة أو ضد السلسلة الخفيفة (A) أو وسم متعدد لكريات مقرونة بالمناطق المختلفة للعامل الثامن (B) أو مع ببتيدات صناعية يمكن أن تقلد المثبتات (C). وهكذا بعد مرور للكريات والفيكواريترين أمام الليزرين، يجرى تحليل دقيق للبروفيل الحامتي للمثبتات الموجودة في كمية قليلة من البلازما المجرأة في بئر واحد وبوقت منخفض.

فائدة دراسة تموضع حواتم المثبتات عند مرضى الناعور A بتقنية x-MAP:

منذ عام 1975، تقنية البيئزدا هي "المعيار الذهبي" الموصى به في المخبر لكشف المثبتات ومعايرتها، لكن بسبب إمكانية افتراق المعقد: ضد ذاتي/ العامل الثامن في المخبر فإنه يمكن تقليل شأن القدرة المثبّطة للضد الذاتي. التدبير العلاجي قد لا يكون مثالياً وخاصة توقع حادث نزفي<sup>20</sup>، ستسمح تقنية x-MAP بكشف المثبتات كلها بغض النظر عن حرائكية فعلها (حركية I أو II) وستوفر إذاً معلومات مخبرية مكملة للطريقة المرجعية.

وهي ستسمح، فضلاً عن كشف المثبتات، بموضوعة حواتم مثبّطات العامل الثامن ويفهم أفضل لآلياتها الفيريولوجية المرضية، وهذا سيسهم في تحسين معارفنا عن هذا المرض.

في عام 2008 وباستخدام تقنية x-MAP، Lavigne-Lissalde وزملاؤها، كشفوا وحددوا نوعية حواتم أضداد العامل الثامن لـ 8 مرضى ناعور A مكتسب و 23 مريض ناعور A خلقي، وتم إظهار وجود بروفيلين مختلفين للحواتم: بروفيل وحيد النوعية (anti-LC) للأضداد الذاتية و بروفيل عديد النوعية للأضداد الخيفية<sup>19</sup>. أظهرت هذه التقنية إذاً فائدتها في تحليل بروفيل حواتم المثبتات ومتابعتها إن كانت أضداداً ذاتية أو خيفية.

في عام 2008 طوّرت Lavigne-Lissalde وزملاؤها فحصاً مخبرياً نصف كمّي معتمداً على تقنية x-MAP وقادراً على كشف الرد المناعي الخلطي ضد العامل الثامن وتحليله<sup>19</sup>، بفضل تعاون فرنسي متعدد المراكز حلّل بروفيل الحواتم وحلّل تحت الصنف المناعي باستخدام تقنية x-MAP لـ 34 مريض ناعور A شديد عولجوا بإحداث التحمل المناعي، سمحت النتائج الملاحظة

**التوزع الديموغرافي للمرضى:** توزع المرضى على مختلف المحافظات السورية (دمشق: 4، ريف دمشق: 3، حلب: 6، اللاذقية: 8، حماه: 2، السويداء: 1، القامشلي: 1، درعا: 1).

19 مريضاً (73%) كان لديهم النمط الشديد للناعور (عامل ثامن >1%) في حين كان 7 مرضى (27%) من النمط متوسط الشدة (عامل ثامن 1-5%).

**جمع العينات:** تم الحصول على الموافقة المستنيرة من للمرضى جميعهم قبل سحب عينات دم لهم.

جمعت البلازما بسحب 5 مل دم كامل على أنابيب مخلّاة من الهواء تحوي سيترات الصوديوم الثلاثية بنسبة 10/1 كمانع تخثر، أُجريت تنبيذ الأنابيب بسرعة 3000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة، ثم فصلت البلازما ووزعت بأنابيب بلاستيكية وحفظت بالتجميد بدرجة -40° م إلى حين إجراء الاختبارات.

**الدراسة العملية:** أُجريت على مرحلتين:

**المرحلة الأولى:** التأكّد من وجود أضداد العامل الثامن بإجراء اختبار التصحيح أو المزج، كشف المتبّطات (عدّت المتبّطات إيجابية إذا كان العيار  $\leq 0.6$  وحدة بيتيزدا/مل) وعيارها بطريقة بيتيزدا، وذلك باستخدام كواشف من شركة Diamed السويسرية وجهاز نصف آلي لقياس التخثر CD4 من الشركة نفسها. أُجريت هذه الاختبارات في سورية في مخبر الجمعية السورية لمرضى الناعور.

**المرحلة الثانية:** دراسة تموضع الحواتم ( Epitope Mapping ) وتحديد تحت الأصناف للنمط الأُسوي G (IgG subclasses) لمبّطات العامل الثامن anti-FVIII باستخدام تقنية x-MAP .

بين بروفييل الحواتم ونتيجة العلاج باعتماد استخدام هذه الوسيلة، وأكدت النتائج السابقة المنشورة من قبل فريق Van Helden (معطيات شخصية).

في عام 2009 وفي دراسة أولية أُجريت على 60 مريضاً مصاباً بالناعور المكتسب، سمح فريق العمل بتحسين مصداقية التحليل المتزامن لبروفيل الحواتم وتوثيقه، الأصناف وتحت الأصناف لل IgG للأضداد الذاتية منذ تشخيص المرض وحتى 12 شهراً. حلّل بروفييل الحواتم للأنماط الأُسوية لأضداد العامل الثامن ولتحت الأصناف لل IgG لكل عيّنة متابغة للمريض نفسه قد أُجريت بزمن عمل وكمية قليلة جداً من عينة البلازما (أقل من 100 ميكروليتر). هذه النتائج تبدو مشجّعة للسماح في المستقبل بتعرّف على عوامل جديدة منبئة بالحوادث النزفية المختلفة بحسب المرض المرافق (فيد النشر).

تقدّم إذاً هذه الوسيلة إمكانية موضعة حواتم أضداد العامل الثامن بشكل سريع، فعّال (إعادة النتائج خلال 24 ساعة) وقليل الاستهلاك (100 ميكروليتر بلازما) ممّا يجعلها تبدو المكمل المثالي لطريقة البييتيزدا في دراسة الفيزيولوجيا المرضية لأضداد العامل الثامن عند مرضى الناعور A<sup>21</sup>.

**هدف البحث:**

إجراء موضعة الحواتم Eepitope Mapping باستخدام تقنية Luminex(x-MAP) لدراسة الرد المناعي ضد العامل الثامن لدى مرضى الناعور A بهدف تحديد نوعية الحواتم المستهدفة وتحديد تحت الصنف لأضداد العامل الثامن IgG وأهميته في تدبير مرضى الناعور A.

**المرضى وطرائق الدراسة: Patients & Methods**

شملت الدراسة 26 مريض ناعور A أبدوا عدم استجابة للعلاج بالعامل الثامن عند حدوث نزف .

العياري + 3 انحرافات معيارية). كانت تعدُّ البلازما ايجابية الأضداد إذا كانت قيمة RAR < 1. **الدراسة الإحصائية:**

استعملت قيم الوسطي والمجال لوصف المتغيرات المستمرة، والانتشار "الترددات" للمتغيرات الفئوية. أجريت مقارنة بين النمط الظاهري الشديد والمتوسط لمرضى الناعور A باستخدام اختبار Kruskal-Wallis. كان مستوى الدلالة 5% للتحليلات كلها، استخدم اختبار Wilcoxon و Fisher لكشف مستويات مختلفة للمتغيرات المستمرة والفئوية بين مرضى الناعور.

#### النتائج:

كان متوسط العمر 20 سنة (4-50) لدى مرضى النمط الشديد، و 8 سنوات (1-31) لدى مرضى النمط متوسط الشدة.

متوسط عيار المثبتات كان: 4.8 (0.67-93.4) وحدة بيتيزدا/مل لدى مرضى النمط الشديد، 0.9 (0.6-2.6) وحدة بيتيزدا/مل لدى مرضى النمط المتوسط.

عيار المثبتات كان عالياً (< 5 وحدة بيتيزدا/مل) لدى 36.4% (26/9) من المرضى بشكل عام و 47.3% من مرضى النمط الشديد (19/9) و 0% من مرضى النمط المتوسط (7/0).

**ارتباط تحت الصنف IgG (IgG1 إلى IgG4) مع المناطق , HC, LC, A2 C2 من العامل الثامن:**

كان الرد المناعي موجهاً تجاه المنطقة LC, HC في 57.7% (26/15)، و 76% (26/19) من الحالات على التوالي.

لوحظ وجود أضداد ضد المنطقة A2 لدى 14 مريضاً (53.8%) في حين كانت الأضداد ضد المنطقة C2 موجودة عند 16 مريضاً (61.5%).

أجريت هذه المرحلة في المركز الوطني للبحث العلمي بكلية الطب بجامعة مونبلييه في فرنسا خلال المدة الزمنية 2010/10-2011/1.

#### قياس تفاعلية الأضداد:

لكشف الأضداد الموجهة ضد السلسلة الخفيفة LC و الثقيلة HC للعامل الثامن، أجريت أولاً مقايسة متعددة معتمدة على تقنية x-MAP، حيث ربطت أضداد وحيدة النسيلة mAbs ESH8 و mAb 8860 إلى حبيبات كربوكسيلية Bio-Rad Laboratories, Hercules، على التوالي، (73،70 على التوالي، CA). ولكشف أضداد المناطق anti-C2 و anti-A2a2، أجريت مرحلة أخرى رُبطت فيها مناطق C2 و A2a2 مأشوبة من العامل الثامن إلى حبيبات كربوكسيلية Bio-Rad Laboratories, Hercules، على التوالي، (73،70 على التوالي، CA) بكميات جزيئية متساوية.

لتحديد تحت الصنف لل IgG (من IgG1 إلى IgG4) للأضداد ضد العامل الثامن استخدمت أضداد خاصة بتحت الصنف موسومة بالفليكواريترين (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

جرى التعبير عن النتائج بمتوسط كثافة الومضان Mean Fluorescence Intensity (MFI) التي قُرئت بجهاز BioPlex™. ولتحديد عتبة الإيجابية، قُورنت تفاعلية بلازما عيارية معوزة العامل الثامن (CTL for negative)

(control, Dade Behring) بتفاعلية عينات بلازما من 30 فرداً غير مصاب بالناعور واختبارات التختّر لديهم طبيعية. وقد عُدَّت ايجابية كل بلازما تجاوزت قيمة متوسط كثافة ومضانها لمتوسط قيمة الشاهد السلبي (الذي أدخل في كل تجربة) مضافاً إليها 3 انحرافات معيارية (SD). النتائج كان يعبر عنها بتفاعلية مستضدية نسبية (RAR) التي تتعلّق ب "نسبة متوسط قراءة الومضان لأضداد المريض/ (متوسط قراءة ومضان

الغالبية العظمى من المرضى الذين طوروا رداً تجاه السلسلة الخفيفة للعامل الثامن anti-FVIII LC 84.2% (19/16) كانت الأضداد لديهم موجهة تجاه المنطقة C2، كذلك الأمر بالنسبة إلى المرضى الذين طوروا رداً تجاه السلسلة الثقيلة للعامل الثامن anti-FVIII HC، كانت هذه الأضداد موجهة تجاه المنطقة A2 لدى 93.3% منهم (15/14). مريض واحد فقط (3.8%) من النمط الشديد كان لديه إيجابية للأضداد الكلية anti-HC,LC دون قدرة على تحديد تحت الصنف مع سلبية الأضداد لحواتم A2, C2.

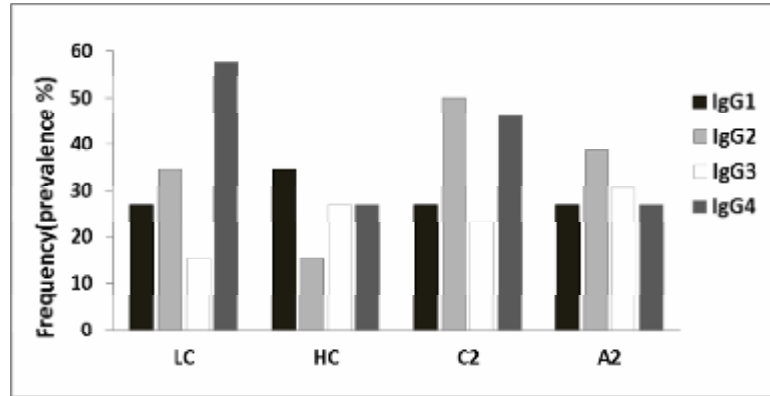
أما بالنسبة إلى الرد المناعي بتحت الأصناف فقد كان كما يأتي: (مخطّط رقم 1)

IgG1 (26.9%, 26.9%, 34.6%, 26.9%) تجاه المناطق LC, HC, C2, A2 على التوالي

IgG2 (34.6%, 50%, 15.4%, 38.5%) تجاه المناطق LC, HC, C2, A2 على التوالي

IgG3 (15.4%, 23%, 26.9%, 30.2%) تجاه المناطق LC, HC, C2, A2 على التوالي

IgG4 (57.7%, 46.1%, 26.9%, 26.9%) تجاه المناطق LC, HC, C2, A2 على التوالي



مخطّط رقم 1: توزّع تحت الصنف IgG لأضداد العامل الثامن

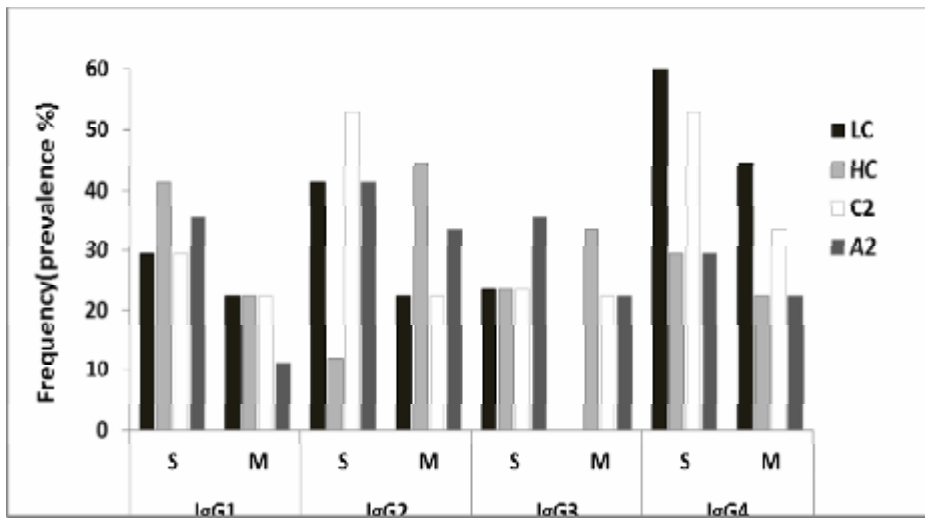
وعند دراسة الرد المناعي تجاه العامل الثامن بحسب النمط الظاهري لمرض الناعور كانت النتائج وفق الجدول الآتي:

جدول رقم 1: توزّع تحت النمط للرد المناعي ضد العامل الثامن بحسب النمط الظاهري للمرض

IgG4 (%)		IgG3 (%)		IgG2 (%)		IgG1 (%)		الحاتمة/ تحت الصنف IgG النمط الظاهري للناعور
متوسط	شديد	متوسط	شديد	متوسط	شديد	متوسط	شديد	
44.4	64.7	0	23.5	22.2	41.2	22.2	29.4	LC
22.2	29.4	33.3	23.5	44.4	11.8	22.2	41.2	HC
33.3	52.9	22.2	23.5	22.2	52.9	22.2	29.4	C2
22.2	29.4	22.2	35.3	33.3	41.2	11.1	35.3	A2

والمخطّط الآتي يوضّح توزّع تحت الصنف IgG ونوعيّة الحواتم للمنبّطات بحسب النمط الظاهري لمرض الناعور لدى المرضى:





مخطط رقم 2: توزع تحت الصنف IgG لأضداد العامل الثامن والحواتم بحسب النمط الظاهري لمرض الناعور

كما لوحظ فرق ذو أهمية إحصائية لعيار المثبتات بين مرضى الناعور الشديد ومرضى الناعور متوسط الشدة ( $P=0.03$ ) كان الارتباط ضعيفاً بين عيار المثبتات والعمر ( $r=0.26$ ).

#### المناقشة:

شكل النمط الظاهري الشديد (عامل ثامن > 1%) 65.4% من مرضى الدراسة، في حين شكل النمط الظاهري متوسط الشدة (عامل ثامن 1-5%) 34.6%.

كان متوسط العمر 20 سنة لدى مرضى الناعور الشديد، و8 سنوات لدى مرضى الناعور المتوسط، ولم تكن هناك قيمة إحصائية لهذا الفارق ( $P=0.17$ )؛ وهذا يتوافق مع التفسير بأن ظهور المثبتات له علاقة بعدد مرات التعرض للعلاج بتعويض العامل الثامن وليس بعمر المريض فقط، فضلاً عن أن هذا الفارق لا يفيدنا كثيراً هنا لأن هذا هو عمر المريض عند إجراء الدراسة وليس عمره لحظة ظهور المثبتات.

كان متوسط عيار المثبتات 4.8 وحدة بيتيزدا/مل لدى مرضى الشكل الشديد، و0.9 وحدة بيتيزدا/مل لدى مرضى الشكل المتوسط، والفرق ذو قيمة إحصائية

التفاعلية المستضدية (RAR) تجاه كل قطعة من العامل الثامن:

قُورنت التفاعلية المستضدية (معبّر عنها بRAR) تجاه كل قطعة من العامل الثامن بين المجموعتين من مرضى الناعور (الشديد والمتوسط الشدة) بالنسبة إلى بروفيل LC, C2, HC, A2 ولم يكن هناك فرق ذو قيمة إحصائية إلا بالنسبة إلى IgG3A2 ( $P=0.04$ ) كان الارتباط بين التفاعلية المستضدية لبروفيل الأضداد وعيار المثبتات ضعيفاً بالنسبة إلى تحت الصنف IgG1, IgG2, IgG3 للقطع كلها من العامل الثامن، في حين أبدى تحت الصنف IgG4 ارتباطاً قوياً للقطع كلها LC, C2, HC, A2 ( $r=0.56, 0.93, 0.78, 0.68$ ) على التوالي.

كما لاحظنا اختلافاً عند تحديد العلاقة لدى المرضى الإيجابيين فقط ( $RAR > 1$ )، إذ كان هناك ارتباط قوي بين شدة التفاعلية المستضدية وعيار المثبتات بالنسبة إلى IgG1, IgG4 HC ( $r=0.60, 0.99$ )، IgG4 C2 ( $r=0.81$ ) على التوالي، وبالنسبة إلى IgG3, IgG4 LC ( $r=0.93, 0.7$ ) على التوالي.

رد مناعي عديد النسيلة Polyclonal يتميز بوجود تحت الأصناف للـ IgG جميعها، لكن مع بروفيل مختلف بحسب المناطق والحواتم، إذ نلاحظ أن تحت الصنف IgG1 قليل الشيوخ (27%) وبشكل متساوٍ مع ارتفاع ملحوظ تجاه المنطقة HC (35%)، IgG2 نسبة حدوثه أعلى خاصة تجاه الحاتمة C2 (50%) وأخفض نسبة تجاه HC (15%)، IgG3 أيضاً مثل IgG1 منخفض الحدوث مع ارتفاع بسيط تجاه الحاتمة A2 (30%)، أما IgG4 فأبدى أعلى نسبة حدوث خاصة تجاه المنطقة LC (58%) وبشكل أدق تجاه الحاتمة C2 (46%) وهذا يدعونا لاستنتاج سيطرة تحت النمط IgG1, IgG3 تجاه المنطقة HC, A2، في حين يبدو النمط IgG2, IgG4 مسيطراً تجاه المنطقة LC, C2 من العامل الثامن وهذه أول دراسة تظهر مثل هذا التمايز بهذا الوضوح. في دراسة لـ van Helden عن تحت النمط (لكن دون ربطها بنوعية الحاتمة) بيّنت سيطرة تحت النمط IgG1 و IgG4 (80، 100%) على التوالي وندرة تحت النمط IgG2 و IgG3 (5، 50%) على التوالي<sup>22</sup>.

و عند مقارنة الرد المناعي بين المرضى بحسب النمط الظاهري نجد بروفيلًا متمثالًا، إذ نلاحظ لدى مرضى النمط الشديد أن تحت الصنف IgG1 أكثر شيوعاً (29-41%) مع ارتفاع ملحوظ تجاه المنطقة HC (41%) و A2 (35%)، نسبة حدوث عالية لـ IgG2 خاصة تجاه الحاتمة C2 (53%) وأخفض نسبة تجاه HC (12%)، IgG3 أيضاً مثله مثل IgG1 منخفض الحدوث (23%) مع ارتفاع بسيط تجاه الحاتمة A2 (35%)، أما IgG4 فكان له أعلى نسبة حدوث خاصة تجاه المنطقة LC (65%) وبشكل أدق تجاه المحددة المستضدية C2 منها (53%). أي أننا نلاحظ البروفيل IgG1, IgG3 تجاه المنطقة HC, A2 والبروفيل IgG2, IgG4 تجاه المنطقة LC, C2 من العامل الثامن.

(P=0.01)، مما يدل على وجود علاقة بين شدة نقص العامل الثامن وتركيز عيار المثبطات. لم يكن هناك دور أو تأثير لعمر المرضى في عيار المثبطات، إذ كان الارتباط ضعيفاً بين عيار المثبطات والعمر (P=0.3, r=0.26).

شكل المرضى الذين لديهم استجابة قوية (عيار المثبطات  $\leq 5$  وحدة بيتيزدا/مل) 34.6% (26/9)، وهذا يعني أن هؤلاء المرضى سيحتاجون حكماً إلى العلاج بعامل تجاوز العامل الثامن (عامل سابع مفعّل أو ركازة مركب البروترومبين)، وهم جميعاً من النمط الشديد، في حين كان عيار المثبطات لدى مرضى النمط المتوسط جميعهم منخفضاً (>5 وحدة بيتيزدا/مل)، ومن ثمّ يمكن علاجهم بالعامل الثامن لكن مع تعديل الجرعة، وهذا يؤكد أن شدة الرد المناعي لدى النمط الشديد أعلى منه لدى النمط المتوسط.

يُظهر تحليل نتائج موضوعة حواتم المثبطات في هذه الدراسة أن الرد المناعي تجاه العامل الثامن هو رد مناعي عديد النوعية، إذ كانت أضداد العامل الثامن Anti-FVIII موجهة ضد المنطقة LC، HC، في 76%، 58% من المرضى، وهذا يتوافق مع نتائج دراسات عالمية مماثلة<sup>19</sup>.

كما كانت معظم المثبطات موجهة ضد الحاتمة A2 (53.8%) و C2 (61.5%)، إذ تشكل الحاتمة C2 هدفاً لمعظم المثبطات الموجهة تجاه السلسلة الخفيفة LC (84.2%) وكذلك الأمر بالنسبة إلى الحاتمة A2 التي شكّلت هدفاً لـ 93.3% من المثبطات الموجهة ضد السلسلة الثقيلة HC للعامل الثامن، وهذه النتائج تتوافق مع ما أظهرته دراسات أخرى مشابهة<sup>21</sup>.

أما بالنسبة إلى تحت الصنف للـ IgG للمثبطات المشكّلة تجاه الأجزاء المختلفة من العامل الثامن فقد لوحظ وجود

**الاستنتاج:**

أكدت نتائج هذه الدراسة أن تقنية Luminex(x-MAP) تقدّم إمكانية تحديد تموضع الحواتم لأضداد العامل الثامن (المنبّطات) لدراسة الرد المناعي لدى مرضى الناعور ومعرفة الحواتم المستهدفة وتحديد تحت صنف الأضداد، ممّا سيكون له دور كبير في توقّع مدى استجابة المريض للعلاج بإحداث التحمّل المناعي وتوقّع الزمن اللازم لاختفاء المنبّطات، ومن ثمّ سيكون مهمّاً توقّع النكس، كما أنّ هذا يقدّم فهماً أفضل شاملاً للرد الخلطي ضد العامل الثامن يمكن أن يساعد على تطوير استراتيجيات وقائية وعلاجية لهؤلاء المرضى، وقد يجنب الحاجة لاستخدام عامل التجاوز المكلف جداً، وترشيد تطبيق العلاج بإحداث التحمّل المناعي ITI، ونحن في بلادنا أحوج ما نكون إلى مثل هذه المعطيات الموجهة للسريريين نظراً إلى التكلفة الباهظة جداً لكلا العلاجين الممكن استخدامهما سواء عامل تجاوز العامل الثامن من شلال التخثر (السابع المفعل) أو العلاج بإحداث التحمّل المناعي ITI. وإن كنا ما نزال بحاجة لإجراء دراسات علمية أكثر عن الرد المناعي لدى مرضى الناعور الذين شكّلوا منبّطات وعلاقته بالعوامل الأخرى المساعدة على تشكيل المنبّطات مثل نوع الطفرة المورثية المسؤولة عن مرض الناعور، النمط الظاهري للمرض (شدة نقص العامل الثامن) فضلاً عن نوع العلاج المستخدم (وقائي أو عند الحاجة) ونوع المنتج الدوائي المستخدم (ركازة عامل ثامن مأشوب أو بلازمي أو نقل بلازما أراسب قري) فضلاً عن العمر عند البدء بالعلاج وعدد أيّام التعرّض للعلاج المعيب بالعامل الثامن.

أما لدى مرضى النمط الظاهري المتوسط الشدة: فنلاحظ أنّ تحت الصنف IgG1 قليل جداً (22%)، نسبة IgG2 حدوثة عالية تجاه الحاتمة C2 (44%) و نسبة أخفض تجاه A2 (33%)، IgG3 أيضاً مثله مثل IgG1 منخفض الحدوث (22%) مع ارتفاع بسيط تجاه الحاتمة HC (33%) ومعدوم تجاه المنطقة LC أما IgG4 فكان له أعلى نسبة حدوث خاصةً تجاه المنطقة LC (44%) الحاتمة C2 منها (33%) أي أننا نلاحظ البروفيل IgG3 تجاه المنطقة HC والبروفيل IgG2, IgG4 تجاه المنطقة LC, C2, A2 من العامل الثامن.

وعند المقارنة بين التفاعلية المستضدية (RAR) تجاه كل قطعة من العامل الثامن بين المجموعتين من مرضى الناعور (الشديد والمتوسط الشدة) بالنسبة إلى بروفيل LC, C2, HC, A2، لم نجد فرقاً ذا قيمة إحصائية بينهما إلا بالنسبة إلى IgG3C2 (P=0.04).

وعند دراسة علاقة التفاعلية المستضدية لبروفيل الأضداد مع عيار المنبّطات لدى المرضى بغض النظر عن النمط الظاهري وجدنا ارتباطاً ضعيفاً بالنسبة إلى تحت الصنف IgG1, IgG2, IgG3 للقطع كلّها من العامل الثامن، في حين أبدى تحت الصنف IgG4 ارتباطاً خطياً قوياً للقطع كلّها LC, C2, HC, A2 ( $r=0.56, 0.93, 0.78, 0.68$ ) على التوالي، وهذا يتوافق مع المعطيات التي أظهرتها بعض الدراسات السابقة<sup>22</sup>.

وعندما أعدنا دراسة وجود هذه العلاقة بين التفاعلية المستضدية الإيجابية فقط ( $RAR > 1$ ) وعيار المنبّطات وجدنا ارتباطاً قوياً بين شدة التفاعلية المستضدية وعيار المنبّطات بالنسبة إلى IgG4 C2 ( $r=0.81$ )، IgG1, IgG4 HC ( $r=0.60, 0.99$ ) على التوالي، و بالنسبة إلى IgG3, IgG4 LC ( $r=0.93, 0.7$ ) على التوالي.

### References

1. Lollar, P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *Thromb Haemost* 2004,2, 1082–1095.
2. Collins PW, Percy CL. Advances in the understanding of acquired haemophilia A : implications for clinical practice. *Br. J. Haematol.*, 2009, 148, 183-194.
3. Mannucci P. Autoimmune haemophilia, *Blood Transfus.*2008, 6, 6-7.
4. Reipert, B.M., van Helden, P.M., Schwarz, H.P. & Hausl, C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br. J. Haematol* 2007, 136, 12–25.
5. Brackmann H.H, Gormsen J. Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder. *Lancet* 1977,2, 933.
6. DiMichele D.M. Kroner, B.L. The North American Immune Tolerance Registry: practices, outcomes, outcome predictors. *Thromb. Haemost* 2002, 87, 52–57.
7. Mariani G, Siragusa S, Kroner BL. Immune tolerance induction in hemophilia A: a review. *Semin Thromb Hemost* 2003, 29, 69–76.
8. Lillicrap, D. The Role of Immunomodulation in the Management of Factor VIII Inhibitors. *Hematology. American Society Hematology Educational Program* 2006, 421–425.
9. Leissinger, C.A. Prophylaxis in haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 2006, 12, (Suppl 6): 67–72.
10. Lavigne-Lissalde.G, Lapalud.P. Qu`est-ce qu`une cartographie d`inhibiteur ?. *L`hemophilie en question. Phase 5* 2010-Paris.39-44.
11. Fulcher, C.A., de Graaf, M.S. & Zimmerman, T.S. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood* 1987, 69, 1475–1480.
12. Shapiro SS. The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin(factorVIII) and the kinetics of their interaction with the factor VIII. *J Clin Invest.*1967;46:147-56.
13. Gawryl MS, Hoyer LW, Inactivation of FVIII activity by two different types of human antibodies, *Blood*, 1982,60, 1103-1109.
14. Gilles, J.G., Arnout, J., Vermeylen, J. & Saint-Remy, J.M. Antifactor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* 1993, 82, 2452–2461.
15. Reding, M.T., Lei, S., Lei, H., Green, D., Gill, J. & Conti-Fine, B.M. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*,2002, 88, 568–575.
16. Prescott R, Nakai H,Saenko EL et al.The inhibitor antibody response is more complex in heamophilia A patients than in most non hemophiliacs with factor VIII autoantibodies. *Recombinant and Kogenate Study Groups. Blood* 1997;89:3663-71.
17. Greninger DA,Saint-Remy JM,Jacquemin M et al,The use of factor VIII/von Willebrand factor concentrate for immune tolerance induction in haemophilia A patients with high title inhibitors:association of clinical outcome with inhibitor epitope profile. *Haemophilia* 2008;14:295-302.
18. Lavigne-Lissalde G, Rothschild C ,Pouplard C et al. Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-FVIII antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;37:67-79.
19. Lavigne-Lissalde G, Tarrade C., Lapalud P, Chtourou S, Schved JF, Granier C, Villard-Saussine S, Simultaneous detection and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies, *Thromb Haemost*, 2008, 99, 1090-1096.
20. Franchini M. Recombinant factor VIIa : A review on its clinical use. *Int J Hematolo*,2006, 83, 126-138.
21. Pfeiffer C, Lapalud.P, Granier.C, Borg JY, Schved JF, Lavigne-Lissalde G.Hémophilie acquise :revue de la pathologie et caractérisation des auto-anticorps anti-facteur-VIII. *Spectra Biologie*, 2010 ;182 :28-38.
22. Van Helden.PM, Van Den Berg.HM, Gouw.SC et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br J Haematol* 2008, 142, 644–652.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2012/1/31.

تاريخ قبوله للنشر 2012/5/22.