

## جستجوی آنتی بادیهای ضد آنتی ژنهای گروه یک HLA در سرم زنان باردار و چگونگی تغییرات تیتر آن در دوران بارداری

دکتر مینو ادیب\*، دکتر مینا ادیب\*\*

### چکیده:

تعیین آنتی ژنهای HLA کاربرد وسیعی در ردابوت، تعیین سازگاری نسجی (در پیوند اعضا) و تشخیص زمینه حساسیت به بیماریها دارد. تعداد زیادی از آنتی سرمهای متنوع برای تیپ بندی HLA مورد نیاز است. این آنتی سرمها را میتوان از سرم زنان باردار، افرادی که تزریق مکرر خون داشته اند، حیوانات مصون شده با لنفوسیت یا از طریق سلولهای هیپریدوما تهیه نمود. در حال حاضر زنان باردار یکی از بهترین منابع برای تهیه آنتی سرمهای HLA هستند. این زنان در مقابل آنتی ژنهای HLA غریبه جینی که از پدر به ارث گرفته است آنتی بادی تولید می کنند. بعلاوه اختلافات ژنتیکی بین نژادهای مختلف و قیمت بسیار بالای آنتی سرمهای HLA، بهتر است این آنتی سرمها از زنان باردار بومی تهیه شود.

در این مطالعه تعداد ۴۰ زن باردار اولزا و ۶۵ زن چندزای ایرانی بصورت ماهیانه (۳ ماه متوالی) از نظر وجود آنتی بادی در سرم، در مقابل لنفوسیت‌های خالص شوهرشان آزمایش شدند. آزمایش به روش میکرو لنفوسیتوتوکسیستی انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) انجام گرفت.

در بین زنان اولزا ۲ مورد (۵ درصد) و در بین چندزایان ۹ مورد (۱۳/۸ درصد) آنتی بادی در سرم خود تولید کرده بودند. تیتر و score آنتی بادی در نمونه های مثبت، بطور ماهیانه تعیین گردید. بالاترین تیتر آنتی بادی در ماه ششم حاملگی مشاهده گردید.

نتایج این مطالعه نشان داد بهترین منبع برای تهیه آنتی بادی، زنان باردار چندزا و بهترین زمان برای تهیه آنتی سرم HLA ماه ششم بارداریست.

کلید واژه ها: آبتنی / پادکن های اج . ال . آ / سرم ایمنی

### مقدمه:

HLA نیاز به تعداد زیادی آنتی سرمهای متنوع میباشد، زیرا آنتی ژنهای این سیستم پلی مرف و از فرد به فردی دیگر متفاوت است (۱). علیرغم وجود منابع متفاوت برای تهیه آنتی سرمهای

شناسایی و تشخیص آنتی ژنهای HLA نقش مهمی در زمینه پیوند اعضا، ردابوت، تشخیص برخی از بیماریها و تجربه در علم پزشکی دارد. برای تشخیص آنتی ژنهای

\* دانشیار گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

\*\* دکتری حرفه ای پزشکی

حذف گردیدند.

#### ۲- تهیه پرسشنامه:

هر یک از زنان باردار از طریق مصاحبه، پرسشنامه‌ای را که دارای سئوالهای زیر بود پر کردند. نام، سن، چندمین حاملگی، ماه چندم حاملگی، نسبت فامیلی با همسر، سابقه تزریق خون و پیوند عضو، سابقه بیماری مهم، آدرس، نام پزشک و بیمارستان. هر یک از بیماران باتفاق همسرشان، رضایت نامه‌ای کتبی مبنی بر تمایل آنها در ادامه این تحقیق را نیز امضاء نمودند.

#### ۳- تهیه سرم از زنان:

از هر زن باردار ۳ بار مقدار ۳ سی سی خون بفواصل هر ۱/۵ ماه گرفته شد و سرم آن جدا و از نظر وجود آنتی بادیهای HLA بر علیه شوهر بررسی گردید. چنانچه پاسخ هر سه بار منفی بود، آن نمونه منفی تلقی می شد و از ادامه مطالعات حذف می گردید. از زنانی که آنتی بادی در سرم آنها وجود داشت هر ماه یکبار نمونه گرفته می شد.

#### ۴- تهیه لئفوسیت از همسر زنان باردار:

برای تهیه لئفوسیت، هر بار مقدار ۵ سی سی خون از همسر هر زن باردار گرفته شد و پس از دفیبرینه نمودن، لئفوسیت‌های آن با استفاده از محلول فایکول‌های پاک جدا گردید (۳) و پس از تنظیم شمارش، مورد استفاده قرار گرفت.

#### ۵- روش تشخیص آنتی بادیهای HLA بر علیه لئفوسیت شوهر در سرم زنان باردار:

همچنانکه قبلاً تذکر داده شد ممکنست در سرم برخی از زنان باردار آنتی بادیهای HLA بر علیه جنین تولید شود. این آنتی بادیها در واقع بر علیه نیمی از HLA جنین است که از پدر به ارث گرفته است و با HLA مادری متفاوت است. بنابراین آنتی بادیهای HLA در سرم مادر در واقع بر علیه نسوج و لئفوسیت‌های پدری است و برای ردیابی این آنتی بادیها کافی است سرم مادر را با لئفوسیت شوهر مجاور نموده و چنانچه آنتی بادی در سرم مادر باشد موجب مرگ لئفوسیت همسرش می‌گردد.

لذا سرم هر زن باردار (همراه با دو کنترل مثبت و دو کنترل منفی) در چهار خانه پلیت ترازاکتی به مقدار یک میکرولیتر در هر خانه کاشته شد، سپس مقدار یک میکرولیتر از لئفوسیت شوهر به آن اضافه گردید و پس

HLA، هنوز بهترین منبع تهیه این آنتی سرمها، سرم زنان باردار و چندزا است. علت تولید آنتی بادی در سرم برخی از زنان، ورود سلولهای غریبه جنینی (که دارای آنتی ژنهای HLA پدری است) به بدن مادر و تحریک پاسخهای ایمنی بصورت تولید آنتی بادی در بدن مادر است (۱،۲).

از آنجائیکه نوع آنتی ژنهای HLA در نژادهای مختلف تا حدی تفاوت دارد ممکنست آنتی سرمهای موجود در بدن زنان باردار نیز از نژادی به نژاد دیگر کمی متفاوت باشد. بهمین دلیل بهتر است آنتی سرمهای تشخیصی را از سرم زنان بصورت منطقه ای تهیه نمود (۲).

در حال حاضر آنتی سرمهای HLA به قیمتی گزاف از کشورهای خارجی تهیه می شود در حالیکه بهترین منبع تهیه آنتی سرم در ایران، بصورت فراوان و رایگان در اختیار است. انجام چنین مهمی احتیاج به جستجوی حضور آنتی بادیهای HLA در سرم هزارها زن باردار ایرانی و سپس تشخیص نوع آنتی بادی در سرم دارد که طرح تحقیقاتی وسیع و گسترده‌ای را می‌طلبد.

تحقیق گنونی بر روی سرم تعداد ۱۰۵ نمونه زن اولزا و یا چندزا، جهت بررسی حضور آنتی بادیهای HLA و سنجش تغییرات تیتراژ آن در دوران بارداری در زنان ایرانی انجام گرفت. علت انتخاب زنان در دوران بارداری این است که بعلت تحریک مجدد سیستم ایمنی توسط آنتی ژنهای HLA غریبه جنینی مقدار و تیتراژ آنتی بادیهای HLA افزایش می یابد و علت بررسی تغییرات تیتراژ آنتی بادی در ماههای مختلف حاملگی این است که بدانیم مناسبترین زمان برای تهیه آنتی سرمهای HLA از سرم، چه ماهی از بارداری است.

#### روش کار:

##### ۱- انتخاب نمونه:

تعداد ۱۰۵ زن باردار در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفتند. انتخاب نمونه‌ها بصورت تصادفی ساده در سطح درمانگاههای مامائی شهر اصفهان بود. هیچیک از زنان مورد مطالعه در سابقه خود، تزریق خون یا فرآورده‌های خونی، پیوند عضو و ازدواج قبلی نداشتند. لذا فاکتورهائی که بنوعی میتواند ایجاد آنتی بادیهای HLA در سرم نماید از مطالعه

۱۱ نمونه مثبت در ماههای مختلف حاملگی در جدول ۲ مشخص شده است.

جدول ۲: تغییرات تیترا آنتی بادی در ماههای مختلف بارداری در نمونه‌های مثبت

ماههای حاملگی نمونه‌های مثبت	۱/۵	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
۱	منفی	۱	۱	۱	۱	۱	منفی	منفی	منفی
۲	منفی	۱	۱	۱	۱	۱	منفی	منفی	منفی
۳	*	*	*	*	*	*	۱	۱	۱
۴	*	*	*	*	*	*	۱	۱	+
۵	*	*	*	*	*	*	۱	۱	+
۶	منفی	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	منفی
۷	منفی	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	منفی
۸	*	*	*	*	*	*	۱	۱	منفی
۹	*	*	*	*	*	*	۱	۱	۱
۱۰ (اولزا)	منفی	منفی	منفی	۱	۱	۱	۱	۱	منفی
۱۱ (اولزا)	*	*	*	*	*	*	۱	۱	منفی

\* بیمار در ماههای بارداری در دسترس نبوده است

منظور از تیترا در اینجا حداقل رقتی از سرم است که با لنفوسیت مربوطه پاسخ چهار مثبت ایجاد نموده است. ضمناً چون در آزمایش میکروسیتوتوکسیسیتی پاسخ آزمایش از یک مثبت تا چهار مثبت متغیر است، برای هر یک از زنان باردار تغییرات جزئی غلظت آنتی بادی بصورت Score<sup>۱</sup> نیز مشخص گردید.

جدول ۳ تغییرات Score آنتی بادی را در یکی از نمونه‌ها (نمونه شماره چهار) نشان میدهد. مشابه این جدول برای نمونه‌های دیگر نیز تهیه شد که جهت رعایت اختصار مقاله از درج نمونه‌های دیگر خودداری می‌شود.

۱- Score از نظر لغوی به معنی ارزش می‌باشد و در اینجا برای نشان دادن ارزش معادل شدت واکنش که بصورت یک مثبت تا چند مثبت نشان داده می‌شود بکار می‌رود.

از مدت زمان‌های لازم کمپلمان، رنگ اتوزین و سپس فرمالین طبق روش استاندارد میکروسیتوتوکسیسیتی انستیتو ملی بهداشت (NIH) اضافه گردید (۴). آنگاه مرگ لنفوسیتی با استفاده از میکروسکوپ اینورت و فاز کنتراست بررسی گردید.

### نتایج:

از بین ۱۰۵ زن باردار که در ماههای مختلف حاملگی مراجعه نمودند، تعداد ۴۰ نفر اولزا و تعداد ۶۵ نفر چندزا بودند. متوسط سن این زنان  $32 \pm 8$  سال بود. از ۱۰۵ نمونه مورد آزمایش، ۴۰ نفر با همسر خود نسبت فامیلی داشتند. زنان مورد مطالعه از نظر تعداد حاملگی، تعداد و درصد موارد مثبت از نظر حضور آنتی بادیهای HLA در سرم، در هر گروه بررسی گردیدند و نتایج مربوطه در جدول ۱ ملاحظه می‌شود.

جدول ۱: فراوانی کل نمونه‌ها از نظر تعداد حاملگی و تعداد و درصد موارد مثبت در هر گروه

نوبت حاملگی	تعداد نمونه	درصد	تعداد موارد مثبت در هر گروه	درصد موارد مثبت در هر گروه
اولین	۴۰	۳۸/۱۰	۲	۵
دومین	۲۲	۲۰/۹۵	۳	۱۳/۶
سومین	۱۵	۱۴/۲۸	۳	۲۰
چهارمین	۹	۸/۵۷	۱	۱۱/۱
پنجمین و بیشتر	۱۹	۱۸/۰۹	۲	۱۰/۵
جمع	۱۰۵	۱۰۰	۱۱	

از بین ۱۰۵ نمونه اولزا و چندزای مورد آزمایش، تنها در ۱۱ نمونه (۱۰/۴۷٪) وجود آنتی بادیهای HLA به اثبات رسید. از زنانی که آنتی بادی در سرم خود داشتند، تقاضا گردید که بصورت ماهیانه ۵ میلی لیتر خون اهداء نمایند تا تغییرات تیترا آنتی بادی در سرم آنها بررسی گردد. تغییرات تیترا آنتی بادی در هر یک از

جدول ۳: تغییرات Score آنتی بادی در ماههای مختلف حاملگی در نمونه شماره چهار

ماه	تیتراژ	۱	۱	۱	۱	۱	Score
		۱	۲	۴	۸	۱۶	
چهارم	Strength	۴۰	۲۰	-	-	-	۱۵
	Score	۸	۴	۱	۱	۱	
پنجم	Strength	۴۰	۴۰	۲۰	۱۰	-	۲۳
	Score	۸	۸	۴	۲	۱	
ششم	Strength	۴۰	۴۰	۴۰	۲۰	۱۰	۳۷
	Score	۸	۸	۸	۶	۲	
هفتم	Strength	۴۰	۲۰	-	-	-	۱۵
	Score	۸	۴	۱	۱	۱	
هشتم	Strength	۴۰	۲۰	-	-	-	۱۵
	Score	۸	۴	۱	۱	۱	
نهم	Strength	۱۰	-	-	-	-	۶
	Score	۲	۱	۱	۱	۱	

### بحث

امروزه سرم زنان باردار، منبعی ارزشمند برای تهیه آنتی سرمهای HLA است این آنتی سرمها که هم اکنون توسط آزمایشگاههای پیوند اعضاء در ایران به قیمتی بسیار گزاف از کشورهای خارجی خریداری می شود، براحتی از سرم زنان باردار چندزاد قابل تهیه و حتی قابل ارسال و فروش به کشورهای خارجی است. همچنین میتوان آنتی سرمهای HLA تهیه شده در ایران را با آزمایشگاههای پیوند اعضاء در دنیا مبادله نمود. این آنتی بادیها ممکنست منواسپسیفیک (فقط یکنوع) و یا پلی اسپسیفیک (مخلوطی از چند نوع آنتی بادی HLA) باشند. که البته نوع منواسپسیفیک آن بسیار ارزشمند، کمیاب و گران قیمت است. تهیه این نوع آنتی بادیها در ایران مستلزم یک طرح تحقیقاتی وسیع و همه جانبه بر روی هزاران زن باردار ایرانی است، چنانچه آنتی بادی ناشناخته با تیتراژ بالا در سرم زنان باردار یافت شود، میتوان طی مراحل خاصی نوع آنتی بادی را مشخص نمود و در صورتیکه ارزشمند باشد، پس از انجام مراحل لازم آنرا بصورت لیوفیلیزه (در مقادیر کم) تهیه و به بازار عرضه نمود.

تحقیق فعلی بمنظور تهیه و تشخیص نوع آنتی بادی از سرم زنان ایرانی انجام نشده است، بلکه تنها به این منظور انجام گرفت تا بدانیم اصولا چند درصد از زنان تکزاد و چند درصد از زنان چندزاد ایرانی (در اصفهان)، آنتی بادی HLA در سرم خود تولید می کنند و میزان

آنتی بادی در چه ماهی از حاملگی در سرم آنها بیشتر است، تا بتوان در ماههای مناسبی از حاملگی سرم حاوی آنتی بادی با تیتراژ بالاتر را تهیه نمود.

نتایج این تحقیق نشان داد که تنها ۵ درصد از زنان تکزاد در مقابل ۱۳/۸ درصد از زنان چندزاد که در این مطالعه شرکت داشتند تولید آنتی بادی HLA نموده‌اند با مروری بر روی نتایج بدست آمده مشخص است که کلاً تیتراژ آنتی بادی در افراد تکزاد پائین تر از افراد چندزاد بوده است. همچنین درصد کمتری از زنان تکزاد در مقابل آنتی ژنهای HLA جنینی آنتی بادی تولید نموده‌اند. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که زنان چندزاد منبع مناسبتری برای تهیه آنتی بادیهای HLA هستند. مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر تولید آنتی بادیهای HLA در اول زها را ۱۰ تا ۱۹ درصد (۵،۶) و در چندزادان ۲۰ تا ۳۰ درصد (۷،۸) گزارش داده‌اند. شیوع این آنتی بادیها در مادران باردار چندزاد در مالزی ۱۸/۶٪ گزارش شده است (۹).

مطالعاتی که در تهران بر روی ۱۰۷۸ زن چندزاد انجام گرفت ۲۷۱ مورد بعبارتی ۲۵ درصد موارد را مثبت گزارش نموده است (۱۰).

در مطالعه کنونی درصد موارد مثبت چه در زنان اولزا و چه در زنان چندزاد کمتر از مطالعات دیگران بدست آمده است. علت این کاهش به احتمال قوی به این دلیل است که ۴۰ نمونه از زوجهای مورد مطالعه نسبت فامیلی داشتند، و با احتمال زیاد مشابهت آنتی ژنهای HLA در این زوجها مانع از تولید آنتی بادیهای HLA در زن باردار شده است. ضمناً تعداد کم نمونه نیز در بروز این اختلاف مؤثر است. با مروری بر نتایج نکات زیر مشخص است:

- ۱- نمونه‌هایی که از ابتدای حاملگی در دسترس بوده‌اند، در ماه دوم معمولاً آنتی بادی در سرمشان موجود نبوده است.
- ۲- در اکثر موارد تیتراژ آنتی بادی در ماههای ششم و هفتم (بخصوص ششم) بیشترین افزایش را نشان می داده است.
- ۳- در تعدادی از موارد تیتراژ آنتی بادی در ماه سوم بیشتر یا معادل با ماه چهارم بوده است اما از ماه ششم کمتر بوده است.
- ۴- در ماه نهم میزان آنتی بادی کاهش یافته است.

- sensitization and renal transplant results. *Transplantation* 1996; 34: 360-363.
3. Boyum A. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and granulocytes by combining centrifugation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; 21(Suppl: 97): 77-89.
  4. Ray JG. NIAID manual of tissue typing techniques. Bethesda: NIH publication. 1979; 80, 545; 39-41
  5. Stastny, P; Tissue typing antisera from immunization by pregnancy. *Tissue Antigens.* 1992; 21; 123-7.
  6. Glassman AB, Bennett CE, Christofer JB. Immunity during pregnancy. *Ann Clin Lab Sci.* 1985; 15(5): 357- 62.
  7. Vives J, Gelabret A, Castillo R. HLA antibodies and period of gestation decline in frequency of positive sera during last trimester. *Tissue Antigens,* 1986; 7: 202-212.
  8. Lulli P, Trabace S, Mazzilli MC, et al. Anti HLA, A, B, C antibodies in the sera of multigravides in labor and after labor. *Immunoematol.* 1990; 27 (3-4): 156-60.
  9. Sukumaran KD, Joo OK. HLA - A and - B antibodies of pregnant mothers in Malaysia. *Med J Malaysia* 1990 Jun; 45(2): 144-7.
  10. Mofidi M, Saraf Nejad A, Khosravi F, et al. Screening of anti HLA class 1 antibodies in multiparous women. Iranian congress of immunology and allergy. Tarbiat Modares University. Tehran 17-19 may 2000.

۵- تیتر آنتی بادی در اول زها اصولاً کمتر از زنان چندزا بوده است.

Vives و Gelabret نیز وجود پیک آنتی بادیهای HLA در ماه ششم در زنان چندزا و افت آنتی بادی در ماه نهم را نشان داده‌اند(۷).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد برای تهیه آنتی بادیهای HLA بهترین منبع زنان چندزا هستند که با شوهر خود نسبت فامیلی ندارند و بهترین زمان برای تهیه سرم از این زنان ماه ششم بارداریست.

پس از تهیه سرم از زنان باردار و اثبات حضور آنتی بادی ناشناخته HLA در سرم بایستی نوع و مرغوبیت آن مشخص شود تا بتوان آنرا در آزمایشگاه پیوند اعضا استفاده نمود، که البته تعیین نوع آنتی بادی در محدوده این کار تحقیقاتی نبوده است.

پیشنهاد می‌شود این کار تحقیقاتی بر روی هزاران زن باردار و چندزای ایرانی انجام گیرد و سرمهای حاوی آنتی HLA بدست آمده در آزمایشگاههای معتبر رفرانس از نظر تشخیص نوع آنتی بادی و مرغوبیت و تعیین تیتر آنتی بادی مورد آزمایش قرار گیرد و بهترین آنها بصورت لیوفیلزه تهیه و در اختیار آزمایشگاههای پیوند اعضا در ایران قرار گیرد تا این آزمایشگاهها را از خرید آنتی سرمهای گرانقیمت مشابه خارجی بی‌نیاز نماید.

#### منابع:

1. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Medical Immunology.* London: Lange publication. 1997: 286-309.
2. Sanfilippo F, Vaughn WK, Lefor WM. Comparative effects of transfusion, pregnancy and prior graft rejection on