خون
فصلنامه پژوهشی
بهار ۸۴ دوره ۲ شماره ۳

بررسی فراوانی آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی اصلی یک و دو (HLA-I,II) در قوم بومی همدان و مقایسه روش مولکولی و سرولوژیک در آنتی‌ژن‌های کلاس دو (لکوس DR)

راضیه امینی[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله[۲]، ملیحه کم‌گویان[۳]، شهرام سمیعی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

هدف از این مطالعه تعیین فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA در جمعیت بومی شهر همدان می‌باشد که علاوه بر استفاده در مطالعات مردم‌شناسی و بیماری‌های مرتبط با HLA، کاربرد وسیعی در بانک پیوند اعضا دارد. به‌منظور راه‌اندازی روش DNA-based HLA Typing در سازمان انتقال خون تهران، با انجام آزمون PCR به روش SSP، مقایسه‌ای بین دو روش مولکولی و سرولوژیک انجام شد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده توصیفی می‌باشد و جامعه مورد مطالعه تمام افراد بومی شهر همدان درنظر گرفته شده است. از ۱۰۰ نفر به‌روش تصادفی نمونه‌گیری انجام شد و افراد موردنظر از بین اهداکنندگان سازمان انتقال خون شهر همدان و از طریق پرسشنامه برگزیده شدند. به‌منظور تعیین آنتی‌ژن‌های HLA کلاس یک و دو و انجام آزمون PCR، به ترتیب ۱۰ میلی‌لیتر خون هپارینه و ۳ میلی‌لیتر خون حاوی EDTA جمع‌آوری شد و نمونه‌های PCR بلافاصله فریز شدند. جداسازی لنفوسیت‌های B و T به روش Nylon Wool adherence صورت گرفت. در این مطالعه از روش آمار توصیفی (فراوانی، درصد) و برای مقایسه نتایج حاصل از دو روش سرولوژیک و مولکولی از آزمون کای‌دو (Chi-square) استفاده شد.

یافته‌ها

فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA کلاس یک و دو در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به ترتیب زیر به‌دست آمد؛ در گروه آنتی‌ژن‌های کلاس یک لکوس A: A25 و HLA-A29 کمترین فراوانی (۲٪)، HLA-A9 بیشترین فراوانی (۲۱٪) را داشتند. درلکوس B: کمترین فراوانی برای HLA-B16 (۱٪) و بیشترین فراوانی برای HLA-B51 (۳۳٪) گزارش شد. در لکوس C: کمترین فراوانی برای HLA-CW5 (۳٪) و بیشترین فراوانی برای HLA-CW4 (۳۳٪) به‌دست آمد. در گروه آنتی‌ژن‌های کلاس دو، لکوس DR: کمترین فراوانی مربوط به HLA-DR8 (۳٪) و بیشترین فراوانی مربوط به HLA-DR11 (۴۷٪) گزارش شد.

نتیجه گیری

در نتایج مقایسه‌ای بر روی ۴۰ نمونه به‌علت این‌که کیت مصرفی Biotest DRB/SSP دارای سطح تفکیک پایینی بود، اختلاف معنی‌داری بین نتایج به‌دست آمده از دو روش در آنتی‌ژن‌های کلاس دو لکوس DR دیده نشد، البته با این حال به علت نداشتن محدودیت‌های موجود در روش سرولوژیک، استفاده از این روش ترجیح داده می‌شود. می‌توان درمرحلهٔ بعدی برای تفکیک برخی ازآنتی‌ژن‌ها درمواردی نظیر واکنش متقاطع وسطح تفکیک بیشتر آللی، ازسطوح تفکیک بالاتراستفاده نمود.

مشخص بودن فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA در اقوام مختلف در مطالعات مردم‌شناسی، مهاجرت‌های هر جمعیت و نیز یافتن اهداکننده سازگار در مراکز مغزاستخوان لازم است و استفاده از روش‌های مولکولی با سطح تفکیک متوسط یا بالا در مراکز اهدای مغزاستخوان موجب تعیین دقیق‌تر و کاهش سازگاری بین دهنده و گیرنده پیوند و در نتیجه بهتر شدن عواقب کلینیکی پیوند خواهد شد.

کلمات کلیدی: HLA، قوم بومی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، لکوس DR

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد خون‌شناسی و انتقال خون- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه انتقال خون ایلام
۲- PhD ایمونولوژی- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- کارشناس ارشد خون‌شناسی و انتقال خون- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی- مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سیستم اصلی سازگاری بافتی، به علت نقش بیولوژیکی گسترده در سیستم ایمنی بسیار مورد توجه می‌باشد. سیستم HLA یکی از پلی‌مورفیک‌ترین سیستم‌های ژنتیکی است که در انسان شناسایی شده است و هر یک از نژادهای عمده دنیا با درجات بالا و پایین فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA و هاپلوتیپ‌های خاص HLA مشخص شده‌اند.

مطالعه آنتی‌ژن‌های HLA به چند دلیل مهم اهمیت دارد:

۱- پیوند بافت و عضو

۲- مطالعات مردم شناسی، مهاجرت‌ها، آمیختگی‌های هر جمعیت

۳- اهمیت بالینی HLA (آنتی‌ژن‌های HLA در ارتباط با استعداد ابتلا به برخی از عفونت‌ها و بیماری‌ها می‌باشند) (۳، ۲، ۱).

فراوانی آنتی‌ژن‌هایHLA-Class I,II ونیز هاپلوتیپ‌های شاخص HLA در جوامع و اقوام مختلف متفاوت می‌باشد.

گروه‌بندی HLA با استفاده از روش سرولوژیک، سیتوتوکسیسیته وابسته به کمپلمان (CDC)، شایع‌ترین روش گروه‌بندی می‌باشد که در این روش لنفوسیت‌های خون محیطی به‌عنوان اهداف و آلوآنتی‌سرم‌های اختصاصی HLA نیز برای شناسایی آنتی‌ژن‌های HLA مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴).

اگرچه روش سرولوژیک متداول است اما محدودیت‌هایی نیز دارد از جمله:

۱- موجود نبودن آنتی‌سرم‌های انسانی و آنتی‌بادی‌های منوکلونال لازم برای شناسایی تمامی انواع آنتی‌ژن‌های HLA به‌ویژه آنتی‌ژن‌هایی که فراوانی کمتری دارند.

۲- وجود واکنش متقاطع در بسیاری از آنتی‌سرم‌ها نظیر HLA-B64 ،B65

۳- محدودیت در استاندارد کردن آنتی‌سرم‌ها

۴- تهیه تعداد کافی سلول زنده برای انجام آزمایش سرولوژیک (۵).

روش‌های PCR با هیبرید کردن پروب‌های اولیگونوکلئوتیدهای دارای توالی ویژه، قادر می‌باشند با استفاده از مقادیر کم DNA به‌طور دقیقی پلی‌مورفیسم‌های ژنی HLA را شناسایی کنند و هم‌چنین برای مطالعه بیماری مرتبط با HLA مناسب باشند. پیشرفت‌های بعدی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی SSP[1] روش‌های سریع‌تری می‌باشند و به‌طور فزاینده‌ای در تعیین C و HLA-A, B، HLA-DR, DQ مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷، ۶).

عدم شناسایی تمام آنتی‌ژن‌های HLA به‌علت عدم دسترسی به آنتی‌سرم برای برخی از آنتی‌ژن‌های HLA، واکنش متقاطع برخی آنتی‌سرم‌ها و وجود آلل‌های نول که آنتی‌ژن را در سطح سلول بیان نمی‌کنند، با انجام روش DNA-based typing که دارای صحت و دقت بالایی می‌باشد برطرف خواهد شد (۹، ۸).

با توجه به اهمیت شناسایی آنتی‌ژن‌های HLA در اقوام مختلف و نیز صحت و دقت بالای روش‌های DNA-based typing بر آن شدیم تا فراوانی آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی اصلی یک و دو (HLA-I,II) را در قوم بومی شهر همدان بررسی کنیم و مقایسه‌ای بین دو روش مولکولی و سرولوژیک در آنتی‌ژن‌های کلاس دو (لکوس DR) انجام دهیم.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه توصیفی بوده و جامعه مورد مطالعه تمام افراد بومی شهر همدان می‌باشد. تعداد مورد مطالعه ۱۰۰ نفر درنظر گرفته شد و نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی انجام شد. افراد مورد نظر از بین اهداکنندگان سازمان انتقال خون شهر همدان و از طریق تنظیم پرسشنامه در زمینه بومی بودن (افرادی‌که حداقل چهار نسل گذشته آن‌ها ساکن همدان بوده و به زبان فارسی تکلم نموده‌اند) شناسایی شدند (۱۰).

از ۱۰۰ نمونه مورد نظر جهت تعیین آنتی‌ژن‌های HLA-Class I,II با روش سرولوژیک، ۱۰ میلی‌لیتر خون هپارینه (۵۰ میکرولیتر هپارین ۵۰۰۰ واحد) جمع‌آوری شد و به‌طور هم‌زمان ۳ میلی‌لیتر خون در لوله‌های EDTA دار جمع‌آوری و فریز شد تا بر روی ۴۰ مورد از آن‌ها با توجه به نتایج تایپ سرولوژیک آزمون PCR انجام گیرد.

آزمون میکرولنفوسیتوتوکسیسیته به روش استاندارد

1- Sequence-Specific Primers

Archive of SID
www.SID.ir

NIH[1]، بر روی ۱۰۰ نمونه انجام شد. برای انجام آزمایش ابتدا نیاز به جداسازی لنفوسیت‌های B و T بود. جداسازی لنفوسیت‌های B و T به روش Nylon wool adherence انجام شد. لنفوسیت‌های T برای تعیین گروه آنتی‌ژن‌های کلاس یک HLA و لنفوسیت‌های B برای تعیین گروه آنتی‌ژن‌های کلاس دو HLA مورد آزمایش قرار گرفتند.

تعیین گروه آنتی‌ژن‌های کلاس یک HLA با پلیت‌های ۶۰ حفره‌ای حاوی آنتی‌سرم‌های HLA-A, B, C و شاهد مثبت و منفی انجام شد. این پلیت‌ها از شرکت پالایش و پژوهش سازمان انتقال خون تهیه شدند.

آنتی‌ژن‌های کلاس دو HLA نیز با استفاده از پلیت ۷۲ حفره‌ای حاوی آنتی‌سرم‌های DQ و HLA-DR و شاهد منفی- مثبت و شاهد سلول B و T محصول شرکت Biotest شناسایی شدند.

با توجه به نتایج روش سرولوژیک و گزارش موارد بلانک واکنش متقاطع و هموزیگوت، ۴۰ مورد از ۱۰۰ نمونه مورد نظرانتخاب شدند و بر روی آن‌ها آزمون PCR[2] انجام گرفت.

در روش مولکولی و انجام آزمون PCR(SSP) از کیت DRB/SSP (Low Resolution) محصول Biotest استفاده شد و آلل‌های HLA-DRB تعیین گروه شدند.

قبل از انجام آزمایش به منظور استخراج DNA، با استفاده از کیت استخراج DNA محصول (Roche)، DNA از خون کامل جدا شد.

از روش آمار توصیفی (فراوانی، درصد) در مرحلهٔ اول بررسی و آزمون کای‌دو برای مقایسه نتایج روش سرولوژیک و مولکولی استفاده شد.

یافته‌ها

جداول شمارهٔ ۱ تا ۵، توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-Class I,II را در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی نشان می‌دهد وجدول شماره۶، مقایسه نتایج روش مولکولی و سرولوژیک در آنتی‌ژن‌های HLA-DR را نشان می‌دهد.

جدول ۱ : توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-A در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی

Antigen	Effective panel	Positive panel	Antigen Frequency	Gene Frequency
A1	۱۰۰	۱۹	۰/۱۹	۰/۱۴۶
A2	۱۰۰	۲۶	۰/۲۶	۰/۱۴
A3	۱۰۰	۲۲	۰/۲۲	۰/۱۱۷
A9	۱۰۰	۳۱	۰/۳۱	۰/۱۷
A10	۱۰۰	۱۴	۰/۱۴	۰/۰۷۳
A11	۱۰۰	۲۰	۰/۲	۰/۱۰۶
A23(A9)	۱۰۰	۴	۰/۰۴	۰/۰۲۱
A24(A9)	۱۰۰	۲۶	۰/۲۶	۰/۱۴
A25(A10)	۱۰۰	۲	۰/۰۲	۰/۰۱۱
A29(A19)	۱۰۰	۲	۰/۰۲	۰/۰۱۱
A33(A19)	۱۰۰	۸	۰/۰۸	۰/۰۴۱

1- National Institue of Health
2- Polymerase chain reaction

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ : توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-B در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی

Gene Frequency	Antigen Frequency	Positive panel	Effective panel	Antigen
۰/۰۲۱	۰/۰۴	۴	۱۰۰	B15
۰/۰۳۶	۰/۰۷	۷	۱۰۰	B7
۰/۰۲۶	۰/۰۵	۵	۱۰۰	B8
۰/۰۵۲	۰/۱	۱۰	۱۰۰	B13
۰/۰۱۱	۰/۰۲	۲	۱۰۰	B14
۰/۰۱۱	۰/۰۲	۲	۱۰۰	B15
۰/۰۰۶	۰/۰۱	۱	۱۰۰	B16
۰/۰۶۲	۰/۱۲	۱۲	۱۰۰	B17
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	B18
۰/۰۰۷۹	۰/۱۵	۱۵	۱۰۰	B21
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	B22
۰/۰۲۶	۰/۰۵	۵	۱۰۰	B27
۰/۰۶۲	۰/۱۲	۱۲	۱۰۰	B35
۰/۰۶۸	۰/۱۳	۱۳	۱۰۰	B44(B12)
۰	۰	*nt	۱۰۰	B45(B12)
۰/۱۸۲	۰/۳۳	۳۳	۱۰۰	B51(B5)
۰/۰۳۶	۰/۰۷	۷	۱۰۰	B55(B22)
۰	۰	* nt	۱۰۰	B56(B22)
۰	۰	*nt	۱۰۰	B60(B40)
۰/۵۴۲	۰/۷۹	۷۹	۱۰۰	BW4
۰/۵۲۱	۰/۷۷	۷۷	۱۰۰	BW6

* آنتی‌سرم مربوطه در پلیت موجود نبوده است (not tested)

جدول ۳ : توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های CW در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی

Gene Frequency	Antigen Frequency	Positive panel	Effective panel	Antigen
۰/۰۵۷	۰/۱۱	۱۱	۱۰۰	CW1
۰/۰۳۶	۰/۰۷	۷	۱۰۰	CW2
۰/۰۲۶	۰/۰۵	۵	۱۰۰	CW3
۰/۱۷۶	۰/۳۲	۳۲	۱۰۰	CW4
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	CW5

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴ : توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های DR در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی

Gene Frequency	Antigen Frequency	Positive panel	Effective panel	Antigen
۰/۰۶۸	۰/۱۳	۱۳	۱۰۰	DR1
۰/۱۵۸	۰/۲۹	۲۹	۱۰۰	DR4
۰/۱۴	۰/۲۶	۲۶	۱۰۰	DR7
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	DR8
۰/۰۵۲	۰/۱	۱۰	۱۰۰	DR10
۰/۲۷۲	۰/۴۷	۴۷	۱۰۰	DR11(DR5)
۰/۰۳۶	۰/۰۷	۷	۱۰۰	DR12(DR5)
۰/۱۱۷	۰/۲۲	۲۲	۱۰۰	DR13(DR6)
۰/۰۲۶	۰/۰۵	۵	۱۰۰	DR14(DR6)
۰/۱۳۴	۰/۲۵	۲۵	۱۰۰	DR15(DR2)
۰/۰۴۱	۰/۰۸	۸	۱۰۰	DR16(DR2)
۰/۰۹۵	۰/۱۸	۱۸	۱۰۰	DR17(DR3)
۰	۰	nt	۱۰۰	DR18(DR3)
۰/۱۶۴	۰/۳	۳۰	۱۰۰	DR51
۰/۵۵۳	۰/۸	۸۰	۱۰۰	DR52
۰/۲۹۳	۰/۵	۵۰	۱۰۰	DR53

جدول ۵ : توزیع فراوانی آنتی‌ژن‌های DQ در ۱۰۰ فرد مورد مطالعه به روش سرولوژی

Gene Frequency	Antigen Frequency	Positive panel	Effective panel	Antigen
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	DQ1
۰/۲۱۳	۰/۳۸	۳۸	۱۰۰	DQ2
۰/۰۱۶	۰/۰۳	۳	۱۰۰	DQ3
۰/۰۲۶	۰/۰۴	۴	۱۰۰	DQ4
۰/۱۹۴	۰/۳۵	۳۵	۱۰۰	DQ5
۰/۰۱۱	۰/۲	۲۰	۱۰۰	DQ6
۰/۳	۰/۵۱	۵۱	۱۰۰	DQ7
۰/۰۶۸	۰/۱۳	۱۳	۱۰۰	DQ8

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶ : مقایسه نتایج روش مولکولی و سرولوژیک در آنتی‌ژن‌های HLA-DR

Method	Molecular N=40	Serologic N=40	X^2	Sig (P-value)
DR1	۴(۱۰)	۴(۱۰)	۰/۰۲۲	۰/۸۸۱
DR4	۷(٪۱۷/۵)	۵(٪۱۲/۵)	۰/۱۹۳	۰/۶۶۱
DR7	۸(٪۲۰)	۸(٪۲۳/۷)	۰/۵	۰/۸۲۳
DR8	۱(٪۲/۵)	۱(٪۲/۵)	۰/۰۰۵	۰/۹۴۳
DR9	۰	۰	۰	۱
DR10	۴(٪۱۰)	۵(٪۱۲/۵)	۰/۲۶۴	۰/۶۰۷
DR11	۱۰(٪۲۵)	۱۲(٪۳۰)	۰/۶۰۴	۰/۴۳۷
DR12	۳(٪۷/۵)	۳(٪۷/۵)	۰/۰۱۶	۰/۸۹۹
DR13	۱۱(٪۲۷/۵)	۸(٪۲۰)	۱/۲۷۵	۰/۳۱۰
DR14	۲(٪۵)	۱(٪۲/۵)	۰/۲۵۱	۰/۶۱۶
DR15	۱۲(٪۳۰)	۱۲(٪۳۰)	۰/۰۸۸	۰/۷۶۹
DR16	۳(٪۷/۵)	۳(٪۵)	۰/۱۲	۰/۷۲۹
DR17	۵(٪۱۲/۵)	۵(٪۱۲/۵)	۰/۰۲۹	۰/۸۶۶
DR18	۰	۰	۰	۱
DR51	۱۱(٪۲۷/۵)	۱۱(٪۲۷/۵)	۰/۰۷۶	۰/۸۰۷
DR52	۲۶(٪۶۵)	۲۶(٪۶۵)	۰/۱۳	۰/۷۱۸
DR53	۱۵(٪۳۷/۵)	۱۳(٪۳۲/۵)	۰/۰۲	۰/۸۸۸

بحث

مقایسه فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-Class I,II حاصل از این مطالعه، با فراوانی مورد مطالعه در ایران و سایر کشورها به‌شرح زیر می‌باشد.

در گروه آنتی‌ژن‌های HLA-A، HLA-A9 بافراوانی (٪۳۱)، بیشترین فراوانی را دارد که عمدتاً زیرشاخهٔ HLA-A24 را دربر می‌گیرد.

HLA-A2 که در جوامع با فراوانی قابل ملاحظه‌ای متداول می‌باشد و در گروه Pan-ethnic Antigens قرار می‌گیرد در جمعیت مورد بررسی همانند جمعیت بومی ایران فراوانی بالایی دارد (۱۲، ۱۱).

تفاوت چشمگیری در فراوانی HLA-A1 (۱۹٪) در گروه مورد بررسی و جمعیت بومی ایران (۱۱٪)، با اکثر جوامع دیده می‌شود، در سایر کشورها HLA-A1 کمتر می‌باشد.

در جمعیت ایران فراوانی HLA-A11، ۲۲٪ که (با A1 واکنش متقاطع دارد) به میزان قابل توجهی بیشتر از HLA-A1 (۱۵٪) می‌باشد. در جمعیت بومی همدان فراوانی این دو تفاوت چندانی ندارد (۲۰٪= A11 و ۱۹٪=A1).

در مورد HLA-A19 بین دو زیرشاخه موجود در پلیت (HLA-A29, A33)، HLA-A33 نسبت به HLA-A29 بیشتر از زیرشاخه‌های دیگر دیده می‌شود.

آنتی‌ژن‌های HLA کلاس I

HLA-A29 کمترین فراوانی را در بین آنتی‌ژن‌های موجود دارد. HLA-A19 فقط در هند بیشترین فراوانی را در آنتی‌ژن‌های لکوس A دارد (۱۴، ۱۳).

در گروه آنتی‌ژن‌های HLA-B، گروه B5 (۵۱/۵۲) با ۳۷٪ بیشترین فراوانی را دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

در جوامع دیگر دنیا این آنتی‌ژن (HLA-B51) فراوانی متوسط تا پایینی دارد. لازم به ذکر است که در اکثر جوامع با نژاد سفید، فراوانی زیرشاخه HLA-B51 بیشتر از زیرشاخه HLA-B52 می باشد و در نپال این فراوانی برعکس می‌باشد (۱۶، ۱۵). HLA-B21 که در اکثر جمعیت‌های دنیا فراوانی قابل توجهی ندارد، در جمعیت مورد بررسی دومین فراوانی را دارد (۱۵٪). در جمعیت بومی ایران نیز فراوانی قابل توجهی دارد (۱۶٪). به‌ویژه زیرشاخه HLA-B50 از این HLA که بیشتر یافت می‌شود. در پلیت مورد استفاده در این بررسی امکان تفکیک زیرشاخه‌های آنتی‌ژن HLA-B21 وجود نداشت.

در مورد HLA-B12 زیرشاخه ۴۴ آن در این مطالعه و جمعیت بومی ایران و جوامع دیگر دنیا بیشتر گزارش شده است.

در این مطالعه HLA-B44 در گروه آنتی‌ژن‌های متداول بوده و در مقایسه با جمعیت بومی ایران به میزان قابل توجهی بالاتر گزارش شده است. به استثنای کره و هند که فراوانی HLA-B44 نسبتاً متداول است، در اکثر جوامع با میزان نسبتاً پایینی گزارش شده است (۱۷).

HLA-B14 در بین نژاد زرد، بومیان استرالیا و اکثر جوامع آسیایی نادر می‌باشد یا وجود ندارد اما در قفقازی‌های غرب و نژاد سیاه با فراوانی ۳ تا ۱۹٪ دیده می‌شود.

HLA-B14 قبلاً در جمعیت پارسی هندوستان و بومی ایران فراوانی بالایی داشت اما در این بررسی و جمعیت بومی ایران، فراوانی پایینی به‌دست آمد. در مورد آنتی‌ژن HLA-B16، میزان آن در نژاد سیاه، بومیان استرالیایی و اسکاتلندی‌ها نادر می‌باشد و یا دیده نمی‌شود درحالی‌که در قفقازی‌ها و ژاپنی‌ها با فراوانی۴ تا ۹٪ وجود دارد(۱۹، ۱۸).

HLA-B60 که در گروه آنتی‌ژن‌های متداول نژادزرد قرار دارد، در چین و فیلیپین رایج می‌باشد اما در کشورهای دیگر و جمعیت بومی ایران با فراوانی کمی دیده می‌شود و در این بررسی نیز گزارش نشده است.

گرچه HLA-B8 در گروه آنتی‌ژن‌های نژاد سفید متداول است ، در جوامع آسیایی نادر گزارش شده است. در جمعیت مورد بررسی و جمعیت ایران نیز با فراوانی نسبتاً پایین وجود دارد (۵٪). در مقابل HLA-B46 در جوامع آسیایی متداول می‌باشد اما در سفیدپوستان وجود ندارد. در این بررسی به‌علت فقدان آنتی‌سرم HLA-B46 در پلیت مورد مطالعه، گزارشی از این آنتی‌ژن به‌دست نیامده اما در مطالعه‌ای بر روی ۱۰۰ مورد در ایران با فراوانی پایین گزارش شده است (۲،۱۹).

در گروه آنتی‌ژن‌های HLA-C، HLA-CW4 که در گروه آنتی‌ژن‌های نژاد سفید قرار دارد، همانند فراوانی آن در جمعیت بومی ایران بیشترین میزان را دارد (۳۲٪).

CW6 و HLA-CW7 در جمعیت بومی ایران دومین فراوانی را دارد. در این پژوهش چون پلیت مورد استفاده فاقد آنتی‌سرم CW6، HLA-CW7 بود، در گروه مورد بررسی شناسایی نشد.

CW1 که در گروه آنتی‌ژن‌های نژاد زرد جنوب قرار دارد در این بررسی دومین فراوانی را به خود اختصاص داده است. در حالی‌که در جوامع دیگر دنیا با فراوانی پایین گزارش شده است (البته در چین با فراوانی متوسط گزارش شده است). در مورد HLA-CW3 برعکس مورد فوق در جوامع دیگر دنیا با فراوانی بالا تا متوسط گزارش شده است و در ایران و جمعیت مورد بررسی با فراوانی پایین گزارش شده است.

HLA-CW4 که در گروه آنتی‌ژن‌های نژاد سفید قرار دارد در این مطالعه و جمعیت بومی ایران همراه با کشورهای هند و اندونزی بیشترین فراوانی را دارد و در شمال چین به میزان قابل توجهی بیشتر از جنوب چین و در جوامع دیگر با میزان فراوانی متوسط گزارش شده است (۱۷، ۱۴).

آنتی‌ژن‌های HLA کلاس II

HLA-DRII(DR5) که در گروه Pan ethnic Antigen قرار دارد، در جمعیت مورد مطالعه و جمعیت بومی ایران بیشترین فراوانی را دارد. در اکثر جوامع HLA-DR5 با فراوانی بالا گزارش شده است.

HLA-DR4 که درگروه Pan ethnic Antigen قراردارد، دراین بررسی دومین فراوانی را دارد درحالی‌که در جمعیت بومی ایران HLA-DR15 دومین فراوانی را داشته است.

Archive of SID

www.SID.ir

HLA-DR7, DR15 در این مطالعه در گروه آنتی‌ژن‌های متداول گزارش شده‌اند.

HLA-DR9 که در گروه آنتی‌ژن‌های نژاد زرد جنوب قراردارد، دراین مطالعه مشاهده نشده و در جمعیت بومی ایران، هند و مالزی با شیوع پایین گزارش شده است اما در کره و چین متداول می‌باشد (۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱).

HLA-DR52, DR53 که‌درگروه Pan ethnic Antigens قرار می‌گیرند، در جمعیت مورد بررسی و درجمعیت بومی ایران HLA-DR52 بیشترین فراوانی را دارد. شیوع HLA-DR53 در هند، اندونزی و جنوب چین، برخلاف شمال چین، کره و ژاپن کمتراز HLA-DR52 است(۱۴، ۲).

در گروه آنتی‌ژن‌های HLA-DQ7, HLA-DQ بالاترین فراوانی را دارد. عدم وجود آنتی‌سرم برای آنتی‌ژن‌های HLA در روش سرولوژیک در شناسایی آنتی‌ژن‌های HLA محدودیت ایجاد می‌کند. این محدودیت دراین پژوهش نیز وجود داشت و عدم دسترسی به آنتی‌سرم برای تمامی آنتی‌ژن‌ها در مقایسه فراوانی آنتی‌ژن‌ها در جمعیت بومی ایران وجوامع دیگردنیانمی‌توانست اطلاعات جامع و دقیقی رافراهم سازد. استفاده ازروش DNA-based HLA Typing جهت به‌دست آوردن اطلاعات دقیق‌تر و جامع‌تر از آنتی‌ژن‌های HLA-Class I,II با توجه به حذف محدودیت‌های روش سرولوژیک، می‌تواند در تشخیص دقیق در این مطالعات مؤثر باشد.

در مرحله دوم مطالعه با تعیین فراوانی آلل‌های DRB با روش PCR و آنتی‌ژن‌های DR در روش سرولوژیک، اختلاف معنی‌داری بین نتایج به‌دست آمده از دو روش دیده نشده و این مسئله به‌علت این است که کیت مصرفی (Biotest DRB/SSP typing) دارای میزان تفکیک پایین می‌باشد و معادل روش سرولوژیک درنظر گرفته می‌شود، البته با این حال به علت نداشتن محدودیت‌های فوق‌الذکر در روش سرولوژیک، استفاده از آن ترجیح داده می‌شود.

در نتایج مقایسه‌ای بر روی ۴۰ نمونه، ۱۲ مورد بلانک در روش سرولوژیک دیده شد که ۵ مورد از آن با روش مولکولی از نظر هموزیگوت بودن تأیید شد و در ۷ مورد، بلانک روش سرولوژیک با حضور یکی از آلل‌های DRB1 شناسایی شد.

موارد بلانک در روش سرولوژیک، می‌تواند تحت تأثیر کافی نبودن تعداد سلول مناسب و واکنش ضعیف آنتی‌سرم یا کمپلمان باشد که این محدودیت‌ها در روش مولکولی وجود ندارد.

در ۲۷ مورد نتایج دو روش کاملاً یکسان بود که به‌علت میزان تفکیک پایین کیت مصرفی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Middleton D, C and Williams FA. History of DNA typing for the human MHC. Immunogenet 1999:135-7.
2- Aizawa M. HLA in Asia-Oceania. Proceedings of the 3rd Asia-Oceania Histocompatibility Workshop-Conferense Hokkaido University Press. 1986: 197-200.
3- Johnson AH, Katovich Hurley C, Hartzman RJ, Human Leukocyte Antigen (HLA). In: Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Saunders Company United States. 1996: 958-59.
4- Bodmer JG, Bodmer WF, Marsh SGE. HLA nomenclature. In: Lechler R and Warrens A. HLA in health and disease. Academic press. London. 2000:4-9.
5- Johnson AH, Katorich Hurley C, Hartzman RJ. Human leukocyte antigen (HLA). In: Henry J.B. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Saunders Company. United States. 1996: 969.
6- Katovich Hurley C, Wade JA, Oudshoorm M, *et al*. A speical repory, histocom patibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. 2003:4.
7- www.worldmarrow.org/testing.html.
8- Nei M. Molecular population genetics and evolution. Front Biol 1975: 199-201.
9- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. Phylogenetic analysis, models and estimation procedures. Am J Hum Genet 1967: 233-57.
۱۰- اقبالیان، محمدجواد، شهرنشینی و توسعه. ماهنامهٔ هکمتانه، شمارهٔ ۴۲، چاپ امور فرهنگی شهرداری همدان. ۱۳۷۹.
11- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ betagene contributes to susceptibility and resistance to Insulin-dependent diabets melitus. Nature, 1987: 599-604.
12- Aizawa M. Wakisaka N T, Yoshiki AK. HLA in Oceania. Sapporo. Japan. 1986: 580.
13- Hanihara K. Kirk R, Szathmary E. The population history of the Japanese. Conberra. 1985: 105-112.
۱۴- فراوانی حاصل از بیش از ۱۰۰۰۰ گروه‌بندی HLA-I,II که در بخش پیوند سازمان انتقال خون ایران انجام شده است و در طرح بانک HLA ایران عئوان شده است.
15- Baur MP, Danilovs JA. Population analysis of HLA-A,-B,-C,-DR and other genetic markers. In: Terasaki P.I.Histocompatibility testing. Los Angeles. California. 1980: 955-93.
16- Hsia S, Word FE, Chen WAY, Amos DB. HLA antigens in Chinese population. Tissue Antigens, 1975: 15-22.
17- Joysey VC, Roger JH, Abbas A, *et al*. Study of a malay population histocompatibility testing. Munksgaord. Copenhagen. 1972: 251-260.
18- Aizawa M, Natori T, Akemi W, Yoshiki K. HLA in Asia-Oceania. Sapporo. Japan. 1986: 200.
19- Ting A. Wee GB Simons MJ Morris P.J. The distribution of HLA-A leukocyte antigens. 1971: 258-64.

Archive of SID

www.SID.ir

HLA-Class I and II frequencies in ethnic Hamedani people, and the comparison of serological and molecular (PCR) methods for HLA-Class II

Amini R.[1,2], Pourfathollah A.A.[1,3], Kamgooyan M.[1], Samiee Sh.[1]

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[2]*Ilam Blood Transfusion Center*
[3]*Tarbiat Modarres University*

Abstract

Background and Objectives
In this study our aim was to determine HLA-Class I and II antigens freguencies of Hamedani ethnic group. In addition to demographic studies and disease association, it has wide application in bone marrow donor registeries.

Materials and Methods
In order to establish DNA-based HLA typing in central Laboratory of Iranian Blood Transfusion Organization, a comparison of serological and molecular (sequence specific primers "SSP") methods for HLA-DRB has been performed. The study was descriptive and the population under study were selected out of the native people of Hamedan; 100 healthy volunteer blood donors were chosen by questionnaire. 10ml heparinized and 3ml EDTA blood were collected from each selected donor. EDTA (PCR) samples were then frozen.

Results
N.I.H standard microlymphocytotoxicity and Nylon wool T and B cells separation was used for serological I and II typing. HLA-Class I plates were prepared from Iranian Blood Fractionation and Research Company and for Class II we used Biotest DR/DQ Typing Trays. PCR was done using "Roche high pure DNA extraction" Kit and HLA-DRBSSP (Biotest). The most and least frequent HLA-B antigens were B5 group (B51/B52) and B16 (38,39) respectively. Because of low resolution of HLA-DRB Kit, no significant difference was observed between serological and PCR methods. Although some blanks have been determined by PCR.

Conclusions
The HLA-DRB determination by PCR is mandatory for donor/recipient pairs (even sibling) for bone marrow transplantation; for donors it should be done by high resolution kits.

Key words: HLA, Ethnic, DRB, PCR

Correspondence: Amini, R. M.S. IBTO-Research Center
Tel.: (+98841) 3333142; Fax : (+98841) 3337601
E-mail: *ramini2001ca@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir