خون
دوره ۶ شماره ۱ بهار ۸۸ (۴۰-۳۱)

ارتباط عدم شباهت آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی HA-1 و وقوع GVHD حاد پس از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز

دکتر مژگان شایگان[۱]، سعید محمدی[۲]، شهرام سمیعی[۳]، دکتر کامران علی مقدم[۴]، دکتر غلامرضا بابایی[۵]، اندیشه قشقایی[۶]، شهربانو رستمی[۶]، دکتر فرناز خاتمی[۷]، دکتر آزیتا آذرکیوان[۸]، دکتر سیما ذوالفقاری انارکی[۹]، زهرا عطایی[۱۰]، دکتر اردشیر قوام‌زاده[۱۱]

چکیده

سابقه و هدف

ناسازگاری HA-1 بین گیرنده و دهنده سلول‌های بنیادی خونساز با بروز GVHD حاد مطرح شده است. لذا هدف این مطالعه ارزیابی فراوانی HA-1 و پایش ارتباط بین ناسازگاری HA-1 و بروز GVHD در بیماران ایرانی دریافت کننده پیوند سلول‌های بنیادی خونساز از خواهر یا برادر با شباهت HLA-A2 بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. DNA استخراج شده از ۵۵ جفت گیرنده ـ دهنده $HLA\text{-}A2^{+}$ جمع‌آوری گردید. تمامی بیماران پیوند، سلول‌های بنیادی خونساز را از منشا خون محیطی، از خواهر یا برادر با شباهت HLA دریافت کرده بودند. HA-1 به وسیله روش SSP-PCR شناسایی شد. یافته‌ها توسط نرم افزار ۱۱/۵ SPSS و آزمون‌های کای‌دو، z test و من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

۲۵ نفر از بیماران فاقد عارضه GVHD و ۳۰ نفر، دارای این عارضه با Grade (I-IV) بودند. فراوانی آلل‌های HA-1R و HA-1H در بیماران(دریافت کننده پیوند) به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۵۵ بود که تفاوت آشکاری با فراوانی این آلل‌ها در اهداکنندگان پیوند(۰/۵۳ و ۰/۴۷) نشان نداد. ناسازگاری HA-1 در ۸ جفت(۱۴/۵٪) از ۵۵ جفت گیرنده و دهنده پیوند شناسایی شد که ۶ مورد از بیماران با عدم تشابه آنتی‌ژنی دچار عارضه GVHD شده و ۲ مورد در گروه GVHD(۸٪) بودند. آزمون آماری همبستگی X^2 نشان داد که وقوع GVHD در دو گروه سازگار و ناسازگار تفاوتی ندارد.

نتیجه گیری

علی‌رغم فراوانی بیشتر ناسازگاری HA-1 در گروه +GVHD ، نتایج حاصله بیانگر ارتباط آشکار بین ناسازگاری HA-1 و خطر بروز GVHD حاد نمی‌باشد. برای اثبات این عامل، پیشنهاد می‌شود این آنتی‌ژن با سایر آنتی‌ژن‌های ناسازگاری فرعی توأماً بررسی شوند.

کلمات کلیدی: PCR ، بیماری پیوند علیه میزبان، آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی، پیوند سلول‌های بنیادی خونساز

تاریخ دریافت : ۸۷/ ۲/۱۵
تاریخ پذیرش : ۸۷/ ۸/۲۵

۱ـ نویسنده مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲ـ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳ـ کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۵ـ PhD آمار حیاتی ـ دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۶ـ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۷ـ پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۸ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۹ـ متخصص آسیب‌شناسی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۱۰ـ کارشناس بیولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۱۱ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

GVHD (Graft Versus Host Disease) و عود لوکمیا دو عارضه اصلی پیوند آلوژنیک مغز استخوان بین خواهر و برادر با شباهت HLA (Human Leukocyte Antigen) محسوب می‌شوند. GVHD در ۳۵٪-۱۰٪ موارد پیوند بین جفت‌های دهنده و گیرنده با شباهت HLA روی می‌دهد(۱). این عارضه به وسیله سلول‌های T که میزان آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی(minor = mHAgs Histocompatibility Antigens) متفاوت بین دهنده و گیرنده را شناسایی می‌نمایند، آغاز می‌گردد(۲). دخالت احتمالی این آنتی‌ژن‌ها در رد پیوند در انسان، از سال ۱۹۷۶ توسط گولمی مطرح شد. این نظر با مشاهده بالینی بیمار مؤنث دریافت کننده پیوند از برادر خود تایید شد. در مقایسه با آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی اصلی mHAgs مسؤول رد مزمن و آهسته‌تر می‌باشند و توانایی آن‌ها در تحریک رد پیوند به اندازه آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی اصلی نمی‌باشد(۴، ۳). این آنتی‌ژن‌ها که در ابتدا به عنوان آنتی‌ژن‌های غیر MHC اطلاق شدند، در واقع محصولات ژن‌های پلی‌مرفیک متفاوت بین دهنده و گیرنده می‌باشند که توسط آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی اصلی(HLA-I ، HLA-II) در سطح سلول‌ها عرضه شده و به وسیله سلول‌های T دهنده شناسایی می‌شوند(۵). ژن‌های کدکننده mHAgs در هر دو فرد اهداکننده و گیرنده پیوند وجود دارند اما در نواحی کد کننده متفاوت هستند(۶). به علت تعداد زیاد(۷۲۰ عدد در موش و بیش از آن در انسان)، فقط دوقلوهای مشابه دارای تشابه در همه آنتی‌ژن‌های پیوندی هستند و خواهر و برادر با شباهت HLA احتمالاً در نیمی از این آنتی‌ژن‌ها دارای تشابه می‌باشند(۷). خواهر و برادر ناسازگار از نظر mHAgs در خانواده‌هایی که یک یا هر دو والد برای این آنتی‌ژن‌ها هتروزیگوت هستند، دیده می‌شوند. در صورتی که اهداکننده پیوند، برای یک آلل mHAg هتروزیگوت و گیرنده هتروزیگوت یا هموزیگوت و نامشابه با دهنده است، جفت ناسازگار خوانده می‌شود(۱).

mHAgs به دو نوع تقسیم می‌شوند:

۱- کلاسیک: آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی روی کروموزوم Y (یا آنتی‌ژن‌های HY و آنالوگ‌های آن‌ها روی کروموزوم X) و آنتی‌ژن‌های HA-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 .

۲- مدرن: CD31 یا PECAM = Platelet – Endothelial Adhesion Molecule و آنتی‌ژن‌های پلاکتی انسان(HPA = Human Platelet Antigens)(۳).

mHAgs از نظر ظهور بافتی با یکدیگر تفاوت دارند. در برخی از گزارش‌ها مطرح شده که همه mHAgs به طور طبیعی بر روی سلول‌های خونی و بر روی سلول‌های پیش‌ساز خونساز به صورت تمایزی حضور دارند(۸). ظهور بافتی برخی از آن‌ها نظیر HA-1 و HA-2 ، فقط محدود به سیستم خونسازی هستند. در حالی که آنتی‌ژن‌های HY و HA-3 در همه جا ابراز می‌شوند(۳). هم چنین گزارش شده که آنتی‌ژن‌های HA- 3, 4, 5, 6, 7 به وسیله سلول‌های خونساز، اندوتلیال، اپی‌تلیال و فیبروبلاست‌ها ابراز می‌شوند(۹).

گولمی و همکاران مشاهده نمودند که رابطه آشکاری بین GVHD و عدم سازگاری HA-1 به تنهایی یا با یکی از آنتی‌ژن‌های HA-2 ، HA-4 ، HA-5 وجود دارد. لذا به این آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی که دارای اهمیت بالینی هستند، Major mHAgs اطلاق نمودند(۱). این آنتی‌ژن محدود به HLA-A2 است و دارای ۲ آلل است(HA-A1H ، HA-A1R) که محصولات آن‌ها دارای جایگزینی هیستیدین با آرژنین می‌باشند و وفور آن‌ها به ترتیب ۶۹٪ و ۳۱٪ در افراد $HLA\text{-}A2^{+}$ می‌باشد(۴، ۲).

با توجه به گزارش‌های متناقض در تأثیر آنتی‌ژن‌های HA-1 بر وقوع GVHD و عدم بررسی این آنتی‌ژن‌ها در بین دهندگان و گیرندگان سلول‌های بنیادی خونساز در کشور نیز عدم وجود اطلاعات در این زمینه، بر آن شدیم تا به بررسی مولکولی این دو آنتی‌ژن بین خواهر و برادران دهنده و گیرنده HSCT در رابطه با وقوع یا عدم وقوع GVHD بپردازیم. در صورتی که رابطه بین این دو عامل محرز گردد، شاید بتوان از طریق تعیین این دو آنتی‌ژن قبل از پیوند بین جفت‌های دهنده و گیرنده‌ای که از طریق HLA-typing مناسب پیوند شناخته شده‌اند، به عنوان یک عامل پیش‌آگهی دهنده به درمان به موقع GVHD پرداخت. هم چنین با توجه به بروز اختصاصی HA-1 بر روی

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های بنیادی، امکان بهره‌برداری در ایمونوتراپی نیز وجود دارد که این امر نیاز به بررسی‌های بیشتر پس از تعیین HA-1 و بررسی فعالیت CTL خون محیطی(سلول‌های T سایتوتوکسیک) اختصاصی ضد این آنتی‌ژن دارد(۱۰).

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. جامعه مورد مطالعه بیماران مبتلا به اختلالات خونی تحت پیوند سلول‌های بنیادی خونساز خون محیطی، در مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی بیمارستان دکتر علی شریعتی بودند که پیوند سلول‌های بنیادی خونساز را از خواهر یا برادر با شباهت HLA دریافت کرده و +HLA-A2 بودن افراد از معیارهای اولیه ورود به مطالعه لحاظ شده بود.

با مراجعه به بایگانی مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی بیمارستان دکتر علی شریعتی، نمونه DNA ۵۵ جفت از گیرندگان و اهداکنندگان پیوند +HLA-A2 ، انتخاب گردیدند. مشخصات بیماران، شدت GVHD ، جنس، سن و نوع بیماری زمینه‌ای ثبت گردید. با توجه به رابطه حضور HA-1 در افراد $^{+}$HLA-A*0201 و محدودیت‌های این مطالعه در تعیین آلل HLA-A*0201 به روش مولکولی و با توجه به وفور ۹۵٪ آن در سفیدپوستان، مقرر شد در صورت استفاده از DNA افراد و عدم مشاهده باندهای کنترل لازم، نمونه از مطالعه حذف شود. از کیت SSP Minor Histocompatibility Antigen Primer Sets (محصول One Lambda, Inc)، برای بررسی HA-1 استفاده شد و طبق دستورالعمل ارایه شده برای هر نمونه DNA دهنده و گیرنده پیوند، ۲ لوله واکنش جداگانه برای تعیین ژنوتیپ دو آلل مورد نظر(HA-1H و HA-1R) استفاده شد. هر لوله شامل D-Mix(محلول D-Mix حاوی $MgCl_2$-d-NTp) و آغازگر داخلی(آغازگری که سبب تکثیر ژن β2 گلوبولین می‌شود)، آغازگرهای مربوط به آلل(H یا R) و آنزیم Taq پلی‌مراز و نمونه DNA می‌باشد. سپس برای تعیین محتوی هر لوله، طبق برنامه زمانبندی حرارتی، واکنش PCR انجام شد. تقویت ژنوم(مربوط به ژن HA-1) با استفاده از آغازگرهای زیر که مربوط به آلل‌های HA-1R و HA-1H بود و با استفاده از روش SSP-PCR انجام گردید. توالی آغازگر HA-1H(در انتهای '۵ : 345ACACT349 و در انتهای '۳ : 500CTGCA504) و توالی آغازگر HA-1R(در انتهای '۵ : 345ACACT349 و در انتهای '۳ : 500TTGCG504) و قطعه مورد بررسی ۱۹۰ bp است.

از هر نمونه DNA دهنده و گیرنده، مقدار ۱ میکرولیتر به لوله واکنش(Mix) مربوطه اضافه شد به عبارتی محتویات هر لوله واکنش شامل: ۷ میکرولیتر D-Mix ، ۲ میکرولیتر آغازگر(بسته به نوع آلل مورد نظر)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم و ۱ میکرولیتر نمونه DNA بود.

از آن جا که آلل‌های R و H هم در نمونه گیرنده و هم دهنده بررسی می‌شوند، لذا برای هر نمونه DNA گیرنده و دهنده، ۲ لوله یکی برای بررسی آلل R و دیگری برای بررسی آلل H گذاشته شد. برای انجام واکنش PCR ، از ترموسایکلر اپندورف با استفاده از Micro SSP^{TM} PCR $^{(OLI-1)}$ program و برنامه زیر استفاده شد: یک چرخه(در دمای ۹۶°C به مدت ۱۳۰ ثانیه و در ۶۳°C به مدت ۶۰ ثانیه)، نه چرخه(در دمای ۹۶°C به مدت ۱۰ ثانیه و در ۶۳°C به مدت ۶۰ ثانیه)، بیست چرخه(در دمای ۹۶°C به مدت ۱۰ ثانیه و در ۵۹°C به مدت ۵۰ ثانیه و در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه) و پایان برنامه در ۴°C .

اطلاعات جمع‌آوری شده از طریق پرسشنامه وارد رایانه گردید. از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ و آزمون‌های آماری کای‌دو، Z-test و آزمون من‌ویتنی جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. از نظر آماری $p< ۰/۰۵$ ارزشمند تلقی شد. وفور ژنی آلل‌های HA-1 با استفاده از قانون و معادله Hardy-Weinberg محاسبه شدند(۱۱).

یافته ها

بیماران در محدوده سنی ۵۰-۴ سال(با میانگین ۶/۱ ± ۲۶/۲) شامل ۱۶ زن(۲۹/۱٪) و ۳۹ مرد(۷۰/۹٪) و اهداکنندگان شامل ۲۳ زن(۳۴/۶٪) و ۳۱ مرد(۵۶/۴٪) بودند. بیماران مورد مطالعه مبتلا به اختلالات خونی مختلف بوده و در ۳۰ نفر از گیرندگان پیوند، GVHD با درجات مختلف(I-IV) روی داد. به منظور پیشگیری از GVHD ، در همه بیماران متوترکسات(۱/۵-۰/۶ ml/kg) و سیکلوسپورین (۵-۳ ml/kg) استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: وفور فنوتیپی HA-1 در کل جمعیت مورد مطالعه

فنوتیپ HA-1	گیرنده		دهنده		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
RR	۱۴	۲۵/۵	۱۴	۲۵/۵	۲۸	۲۵/۵
RH	۳۲	۵۸/۲	۳۰	۵۴/۵	۶۲	۵۶/۴
HH	۹	۱۶/۴	۱۱	۲۰	۲۰	۱۸/۱
کل	۵۵	۱۰۰	۵۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۰۰

جدول ۲: وفور فنوتیپی HA-1 بر حسب وقوع GVHD

فنوتیپ HA-1	گیرنده $GVHD^+$		گیرنده $GVHD^-$		دهنده $GVHD^+$		دهنده $GVHD^-$		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
RR	۱۳	۴۳/۳	۱	۴	۱۱	۳۶/۷	۳	۱۲	۲۸	۲۵/۵
RH	۱۵	۵۰	۱۷	۶۸	۱۶	۵۳/۳	۱۴	۵۶	۶۲	۵۶/۴
HH	۲	۶/۷	۷	۲۸	۳	۱۰	۸	۳۲	۲۰	۱۸/۱
کل	۳۰	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۳۰	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱۱۰	۱۰۰

۲۱ نفـــر(۳۸/۲٪) از بیمـــاران مبتـــلا بـــه AML ، ۱۱ نفـر(۲۰٪) مبتلا به ALL ، ۱۱ نفر(۲۰٪) مبتلا به CML ، ۵ نفر(۹/۱٪) مبتلا به آنمی آپلاستیک، ۶ نفر(۱۰/۹٪) مبتلا به تالاسمی و ۱ نفر(۱/۸٪) مبتلا به لنفوم بورکیت بودند.

۳۰ نفر از دریافت کنندگان پیوند دچار عارضـه GVHD بـوده و در ۲۵ گیرنـده ایـن عارضـه مـشاهده نـشد. ۱۰ نفر(۳۳/۳٪) از بیماران مبتلا بـه GVHD-I ، ۸ نفـر(۲۶/۷٪) مبتلا به GVHD-II ، ۹ نفر(۲۰٪) مبـتلا بـه GVHD-III و ۳ نفر(۱۰٪) مبتلا به GVHD-IV بودند.

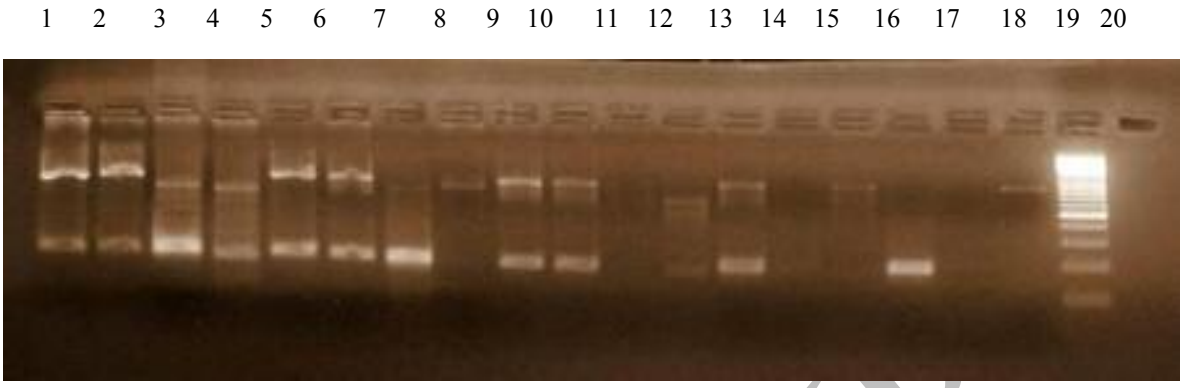
وفور فنوتیپی آنتـی‌ژن‌هـای HA-1 در ۱۱۰ فـرد مـورد بررسی به تفکیک دهنده و گیرنده پیوند در جدول ۱ و بـر حسب وقوع یا عدم وقوع GVHD در جدول ۲ نـشان داده شده‌اند. فراوانی فنوتیپ‌های مشاهده شده با قانون Hardy-Weinberg سـازگار اسـت. لـذا بـر طبـق معادلـه Hardy-Weinberg ، وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H در کل افـراد تحت مطالعـه بـه ترتیـب ۰/۵۴ و ۰/۴۶(در هـر دو گـروه بیماران، مبتلا و فاقد GVHD مورد مطالعه، به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۴۵ و در اهداکنندگان مربوطه به ترتیب ۰/۵۳ و ۰/۴۷) می‌باشنـد کـه از نظـر آمـاری فاقد اختلاف معنادار بین دو گروه است(جدول ۳).

با توجه به قـدرت آنتـی‌ژنـی بـسیار نـاچیز شـکل R ، ناسازگاری بین دهنده و گیرنده به صورت حضور HA-1H (هتروزیگوت HH یا هموزیگوت HR) در گیرنـده و عـدم حضور آن در دهنده تعریف مـی‌شـود(شـکل ۱). تعـداد ۸ ناسازگاری HA-1 در کل بیماران(۱۴/۵٪) مشاهده شد کـه ۶ مـورد(۲۰٪) در گـروه $GVHD^+$(۲ مـورد GVHD-I ، ۲ مورد GVHD-II ، ۱ مـورد GVHD-III و ۱ مـورد GVHD-IV) و ۲ مورد در گروه $GVHD^-$ (۸٪) بودند. آزمون آماری همبـستگی X^2 نـشان داد کـه وقـوع GVHD در دو گـروه سازگار و ناسازگار تفاوتی ندارد.

با استفاده از آزمون مـن ویتنـی مـشخص گردیـد بـین ناسـازگاری HA-1 و GVHD grade نیـز ارتبـاطی وجـود ندارد. هم چنین بین ناسازگاری HA-1 با عوارض پوسـتی، عوارض گوارشی و عوارض کبدی و با بیماری زمینـه‌ای و محدوده سن بیماران ارتباطی مشاهده نشد.

در بررسی جنسیت گیرنده و دهنده، مشاهده شد از نظر وقـوع GVHD در گیرنـده مـذکر(دارای آنتـی‌ژن‌هـای سازگاری نسجی فرعی H-Y) با اهداکننده مؤنث (فاقد این

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: الکتروفوروگرام روی ژل پس از تقویت ژنوم در ۳ جفت گیرنده و اهداکننده $HLA\text{-}A2^{+}$
از چپ) جفت اول : ردیف ۱ و ۲: دهنده +HA-1R ، گیرنده +HA-1R ـ ردیف ۳ و ۴: دهنده +HA-1H ، گیرنده +HA-1H ـ جفت دوم: ردیف ۵ و ۶ : دهنده +HA-1R ، گیرنده +HA-1R ـ ردیف ۷و ۸ : دهنده +HA-1H ، گیرنده – HA-1H ـ ردیف ۹و۱۰ : دهنده +HA-1R ، گیرنده +HA-1R ـ ردیف ۱۲ و ۱۳: دهنده +HA-1H ، گیرنده +HA-1H ـ ردیف ۱۵: نمونهHLA-A2 منفی(جهت کنترل) ـ ردیف ۱۶: فاقد باند کنترل داخلی غیر قابل قبول ـ ۱۸: نمونه HLA-A2 منفی(جهت کنترل) ـ ردیف ۱۹:DNA Ladder 100bp ـ ردیف‌های ۱۱، ۱۴ ،۱۷ و ۲۰ : خالی

جدول ۳: ژنوتیپ آلل‌های HA-1 در جفت‌های گیرنده و دهنده پیوند

ژنوتیپ HA-1		
تعداد (درصد)	گیرنده	دهنده
۶ (۱۱)	HH	HH
۳ (۵/۵)	RH	HH
۲ (۲/۵)	RR	HH
۳ (۵/۵)	HH	RH
۲۳ (۴۲)	RH	RH
۶ (۱۱)	RR	RH
۱ (۲)	HH	*RR
۷ (۱۲/۵)	RH	*RR
۴ (۷)	RR	RR

* بیانگر ناسازگاری HA-1 بین گیرنده و دهنده پیوند می‌باشند.

آنتی‌ژن‌ها) که ۱۶ مورد بودند، نسبت به سایر جفت‌های گیرنده ـ دهنده(مذکر ـ مذکر، مؤنث ـ مؤنث ، مؤنث ـ مذکر)، اختلاف معناداری وجود دارد(آزمون X^2 ، ۰/۰۴۸ =p). ۱۲ مورد از جفت گیرنده ـ دهنده(مذکر ـ مؤنث) در گروه $GVHD^{+}$ و ۴ مورد در گروه $GVHD^{-}$ بودند. از بین ۱۲ جفت گروه $GVHD^{+}$ ، ۴ مورد ناسازگاری HA-1 مشاهده شد که از نظر وقوع GVHD با ناسازگاری HA-1 (آزمون Z با ۰/۰۵ >p) ارتباط معنادار مشاهده شد.

بحث

در مطالعه حاضر از ۵۵ جفت بیمار و اهداکننده سلول‌های بنیادی خونساز خون محیطی مورد مطالعه، ۸ مورد ناسازگاری HA-1 (۱۴/۵٪) مشاهده شد که ۶ مورد(۲۰٪) در گروه $GVHD^{+}$ (۲ مورد GVHD-I ، GVHD-III ۱ مورد و GVHD-IV ۱ مورد) و ۲ مورد در گروه $GVHD^{-}$ (۸٪) بودند. بررسی نشان داد که وقوع GVHD در دو گروه سازگار و ناسازگار تفاوتی ندارد. بین ناسازگاری HA-1 و شدت GVHD نیز ارتباطی مشاهده نشد. این بدان معنا است که در مطالعه حاضر بین ناسازگاری HA-1 به تنهایی با شیوع و شدت GVHD ارتباطی وجود نداشت.

شیوع کلی ناسازگاری HA-1 در مطالعه نسی، ۱۵/۹٪

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد(که مشابه شیوع ۱۴/۵٪ آن در مطالعه حاضر است)، در مطالعه وی ۳۳/۳٪ موارد(۵ نفر از ۱۵ نفر) ناسازگاری HA-1 با GVHD II-IV همراه بود، اما در مطالعه حاضر در ۴ نفر از ۸ نفر یا ۵۰٪ موارد، ناسازگاری HA-1 با GVHD II-IV مشاهده شد که از این نظر با یکدیگر دارای اختلاف معنادار هستند(p< ۰/۰۵). از سویی در مطالعه مذکور این عارضه در ۱۷/۷٪ موارد نیز که فاقد ناسازگاری HA-1 هستند روی داده است، در حالی که در مطالعه حاضر در موارد فقدان ناسازگاری یا شباهت HA-1 این عارضه روی نداده است(۱).

گولمی در مطالعه خود ثابت کرد که در ۱۰۵ جفت گیرنده و دهنده مورد بررسی، بین ناسازگاری HA-1 و وقوع aGVHD در بزرگسالان رابطه وجود دارد اما قادر به اثبات آن در ۴۳ زوج کودک تحت پیوند نشد(۱۲). تی‌سنگ در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۹ ، ناسازگاری HA-1 را در ۱۵/۲٪ از افراد(۲۳۷ جفت پیوندی مورد بررسی) گزارش نمود که با فراوانی گزارش شده در مطالعه حاضر تفاوتی ندارد(۱۳). در ۲۲ نفر از افراد مطالعه فوق(۶۴/۷٪)، علایم بالینی GVHD II-IV مشاهده شد و بر خلاف مطالعه حاضر، مطالعه مذکور رابطه بین ناسازگاری HA-1 و افزایش احتمال وقوع aGVHD را نشان داد. هم چنین آن‌ها گزارش نمودند ضایعات پوستی در بیماران با ناسازگاری HA-1 شدیدتر هستند که مطالعه حاضر هیچ رابطه‌ای بین این عامل و ضایعات مختلف GVHD را نشان نداد.

مطالعه‌های مختلف نیز مشابه مطالعه حاضر بیانگر عدم وجود رابطه بین ناسازگاری HA-1 و GVHD می‌باشند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ بر روی ۲۳۷ بیمار در مرکز تحقیقات فرد هاچینسون توسط مینگ شلین و همکارانش صورت گرفت، ارتباط آشکاری بین ناسازگاری HA-1 و افزایش خطر GVHD دیده نشد(۱۴).

کوگلر و همکاران در مطالعه پلی‌مورفیسم TNF α ، IL-10 و ناسازگاری HA-1 ، Hy و CD31 (کدون ۱۲۵) در ۱۱۵ گیرنده خون بند ناف غیر خویشاوندی، هیچ رابطه‌ای بین ناسازگاری آنتی‌ژن‌های نسجی فرعی HA-1 و Hy (کدون ۱۲۵ آنتی‌ژن CD31) با بروز aGVHD به دنبال پیوند مشاهده ننمودند(۱۵).

برتینتو نیز در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶، آلل‌های R و H آنتی‌ژن HA-1 را در ۷۷ گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی از خواهر و برادر بررسی نمود(۱۶). در این مطالعه نیز گزارشی مبنی بر وجود ارتباط بین ناسازگاری HA-1 و وقوع GVHD مطرح نشد.

کاتاگیری نیز در مطالعه HA-1 ، CD31 و CD46b و CD62L بر روی ۱۰۶ گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی از خواهر و برادر با شباهت HLA ، اعلام نمود شیوع aGVHD علی‌رغم ناسازگاری‌های فوق تفاوتی ندارد(۱۷).

هاینمن در مطالعه خود ارتباط HA-1 و CD31 را در ۱۴۳ بیمار مبتلا به CML که در مرحله مزمن بیماری تحت پیوند سلول‌های بنیادی خونساز از خواهر یا برادر سازگار خود قرار گرفته بودند بررسی نمود و نشان داد که ناسازگاری این دو عامل با افزایش شیوع aGVHD در گروهی از بیماران HLA-B44 مثبت همراه است(p= ۰/۰۱۸). مطالعه عوامل متعدد نشان داده که فقط افزایش سن گیرنده عامل خطر وابسته به HA-1 است و ناسازگاری آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی نسبت به عوامل کلاسیک خطر aGVHD ، از عوامل فرعی محسوب می‌شوند(۱۸).

در مطالعه حاضر بین ناسازگاری HA-1 با عوارض پوستی، گوارشی و کبدی و نیز سن بیماران ارتباطی مشاهده نشد. این نتایج برخلاف نتایج مطالعه تی‌سنگ است. آن‌ها اظهار کردند که بین ناسازگاری HA-1 با عوارض پوستی(p= ۰/۰۲) و گوارشی(p= ۰/۰۰۷) ارتباط معناداری وجود دارد ولی این ارتباط بین عوارض کبدی(p= ۰/۹۲) دیده نشده است. از سویی در مطالعه کنونی ارتباطی بین ناسازگاری HA-1 و سن بیماران با بروز GVHD مشاهده نشد که این نتایج بر خلاف نتایج مطالعه گولمی و همکاران و تی‌سنگ است که این ارتباط را تایید می‌کنند(۱۰، ۵). در مطالعه حاضر بین ناسازگاری HA-1 و شدت GVHD نیز ارتباطی مشاهده نشد هر چند این یافته بر خلاف نتایج مطالعه‌های دیگر است که ارتباط بین ناسازگاری HA-1 را با بروز GVHD با درجات(II-IV) تایید می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط کوگلر و همکاران

www.SID.ir
Archive of SID

صورت گرفته نیز همانند مطالعه حاضر این ارتباط تایید نشده است(۱۵).

در مطالعه کنونی ارتباط هم زمان بین ناسازگاری HA-1 و آنتی‌ژن‌های H-y با بروز GVHD مشاهده شده است(آزمون Z ، p< ۰/۰۵). به عبارتی این یافته حاکی از آن است که ناسازگاری HA-1 ممکن است به تنهایی در بروز GVHD مؤثر نباشد ولی احتمالاً در همراهی با آنتی‌ژن‌های H-y می‌تواند سبب بروز GVHD شود. توجیه احتمالی این مساله آن است که در این موارد آنتی‌ژن‌های H-y در کنار آنتی‌ژن‌های HA-1 در بافت گیرنده توسط لنفوسیت‌های T بافت دهنده شناسایی می‌شوند و سبب بروز GVHD می‌شوند. این یافته بر خلاف نتایج مطالعه گولمی و همکارانش است. آن‌ها در مطالعه خود اظهار داشتند که اثر ناسازگاری H-y (گیرنده مذکر، دهنده مونث) در دو گروه $GVHD^{+}$ و $GVHD^{-}$ یکسان است و این مساله را این گونه توجیه کرده‌اند که آنتی‌ژن های H-y در بافت خونساز و غیر خونساز دیده می‌شوند. حضور این آنتی‌ژن‌ها در بافت پارانشیمی میزبان، ممکن است سبب تحریک تحمل ایمنی در سلول‌های T سایتوتوکسیک ضد میزبان شود(۱۹).

از سویی در مطالعه کوگلر و همکارانش نیز ارتباط بین آنتی‌ژن H-y و بروز GVHD تایید نشده است. از آن جا که در مطالعه مذکور منبع پیوند سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف است، علت این امر احتمالاً نابالغ بودن لنفوسیت‌های T دهنده، پایین بودن تعداد لنفوسیت‌های T تزریق شده، جمعیت انتخابی دندریتیک سل‌ها و کاهش آلو ری اکتیویتی با کاهش توام پاسخ به سایتوکین‌هایی از قبیل TNFα و IFNy است(۱۵).

در مطالعه کنونی وفور فنوتیپی HA-1 در کل جمعیت مورد مطالعه بررسی گردید. وفور فنوتیپی R/R ، R/H و H/H به ترتیب ۲۵/۵٪ ، ۵۶/۴٪ و ۱۸/۱٪ به دست آمد. نتایج حاصل از مطالعه ما با نتایج تحقیقی که در دانشگاه لیدن صورت گرفته یکسان می‌باشد(۲۰). از سویی در مطالعه برتینتو و همکارانش وفور فنوتیپی HA-1 برای حالات مختلف به ترتیب ۴۰٪ و ۴۸٪ و ۱۲٪ گزارش شده‌اند، بررسی آماری نشان داد که وفور فنوتیپ‌های R/R و R/H و H/H در مطالعه کنونی با مطالعه برتینتو دارای اختلاف معناداری نمی‌باشد(Z= ۱/۳۶) R/R ، (Z= ۰/۸۸۴) R/H، (Z= ۰/۵۴) H/H. در مطالعه‌ای که توسط کتزامپاسکی و همکارانش انجام شد، وفور فنوتیپ‌های HA-1 در جمعیت یونانی به ترتیب ۲۳ و ۵۶ و ۲۱ درصد گزارش گردید، که در مقایسه با مطالعه کنونی وفور فنوتیپ R/R(Z= ۰/۲۳) فاقد اختلاف معنادار، وفور فنوتیپ R/H(Z= ۴/۴۴) و H/H(Z= ۳) دارای اختلاف معنادار می‌باشد(۱۶، ۱۴).

در مطالعه کنونی وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H در کل افراد تحت مطالعه به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶ می‌باشد. در مطالعه تی‌سنگ وفور اعلام شده برای HA-1R ، ۵۵/۹٪ و وفور HA-1H، ۴۴/۱٪ می‌باشد(۱۳). بررسی‌های آماری نشان داد که وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H در مطالعه کنونی با این مطالعه دارای اختلاف معنادار(Z=۲) است.

در مطالعه نسی و همکارانش، وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H به ترتیب ۶۵/۷٪ و ۳۴/۳٪ گزارش شده است که در مقایسه با مطالعه کنونی فاقد اختلاف معنادار می‌باشد(Z= ۱/۵) HA-1R و (Z= ۱/۲) HA-1H(۲۱) .

ترلیزی در مطالعه‌ای بر روی ۲۰۰ اهداکننده سالم شمال ایتالیا، وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H را به ترتیب ۷۰/۷٪ و ۲۹/۳٪ گزارش نمود که می‌توان HA-1 را در ۳۲/۸٪ از بیماران تحت پیوند به عنوان شاخصی از کایمریسم بررسی نمود(۲۲). بررسی آماری نشان داد که وفور ژن‌های HA-1R و HA-1H در مطالعه حاضر با این مطالعه دارای اختلاف معنادار می‌باشد(Z=۲) HA-1R و (Z= ۲/۲۷)HA-1H. نتایج به دست آمده برای وفور ژن‌های HA-1 در مطالعه کنونی نشان داد که هم چون سایر مطالعه‌های صورت گرفته، وفور ژن R از H بیشتر است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که وفور کلی آلل‌های HA-1 در جمعیت مورد مطالعه با سایر مطالعه‌ها مشابهت دارد و در بیمارانی که گیرنده پیوند مذکر و اهداکننده پیوند مؤنث هستند، ناسازگاری HA-1 در بروز GVHD مؤثر می‌باشد. در حالی که علی‌رغم بیشتر بودن

Archive of SID
www.SID.ir

تعداد موارد ناسازگاری HA-1 بین دهنده و گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، در گروه GVHD مثبت نسبت به گروه فاقد این عارضه رابطه آماری معنی‌داری بین این دو عامل مشاهده نشد.

با توجه به آن که برخی از آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی فرعی بر روی کروموزوم Y وجود داشته و نتایج این مطالعه بیانگر اثر همراهی ناسازگاری HA-1 با این عوامل در بروز GVHD است، پیشنهاد می‌شود با تعداد نمونه بیشتر سایر آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی نیز مورد مطالعه قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این طرح تحقیقاتی به صورت مشترک بین مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر علی شریعتی(دانشگاه علوم پزشکی تهران) تأمین شده است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و امتنان خود را از همکاری سرکار خانم‌ها: مهناز کواری، سمیرا میس طوطیان، مریم عبدالهی، دکتر آزاده صدری، دکتر ژولیت قالدی، اکرم شهرابی و آقای احسان قاضی اعلام می‌دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References :

1- Maruya E, Saji H, Seki S, Fujii Y, Kato K, Kai S, *et al*. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. Blood 1998; 92 (6): 2169-76.

2- Barrett AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN. New developments in allotransplant immunology. In: Hematology 2003. p. 350-71.

3- Papassavas AC. HLA peptide –mediated strategies for modulation of cellular and Humoral immune response in Transplantation. Available from: URL:http://www.bentham.org/cpg1-1/papassavaz/ papassavas.htm

4- Wilke M, Goulmy E. Minor Histocompatibility Antigens , In: Rose NR, Hamilton RG, DetrickB. Manual of clinical laboratory Immunology. 6 th ed. ASM Press; 2002. p.1201-7.

5- Milosevic S. Identification of minor Histocompatibility Antigens. Munchen 2003. Available from: URL:http://edoc.ub.unimuenchen.de/archive/00001345 /Milosevic_slavoljub.pdf)

6- Murata.M, Warren E, Riddell SR. A Human minor Histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. Available from: URL:http://www.jem.org/cgi/content/full/197/10/1279) ., J Exp Med 2003; 197(10): 127-89.

7- Lu KC, Jaramillo A, Mahanakumar T. Tissue and solid organ allograft rejection. In: Austin KF, Frank MM, Atkinson JP, *et al*. Samster's immunologic disease. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Wilkins; 2001. p. 1121.

8- Van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JH, Kooij-Winkelaar YM, Van Luxemburg-Heijs SA, Goselink HM, *et al*. Recognition of minor Histocompatibility antigens on Lymphocytic and Myeloid Leukemic cells by cytotoxic T cell clones . Blood 1994; 83 (4): 1060-66.

9- Riddell SR, Gavin M, Akatuska Y, Murat M. Minor Histocompatibility antigens in Graft Vs Host Disease and GVL Reactions. Inter J Hematology 2002; (76) :155-61.

10- Matheson B, Xiaojing G. Heterogeneity in HLA-A2 in Asia Ocenic population. Human Immunol 1997; (1-2): 7.

11- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, *et al*. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and the development of graft versus-host disease after bone marrow transplantation. New Engbiomed J 1996; 334(5): 281-5.

12- Tseng LH, Lin MT, Hansen JA, Gooley T, Pei J, Anajane G, *et al*. Correlatoin Between Disparity for the Minor Histocompatibility Antigen HA - 1and the Development of Acute Graft-Versus Host Disease After Allogenic Bone Marreow Transplantation. Blood 1999; 94(8): 2911- 4.

13- Lin LT, Goolry T, Hansen JA, Tseng LHT, Martin EG. Absence of statistically significant correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and out come after allogenic hematopoietic cell transplantation. Blood 2001; 98(10): 3172-3.

14- Kogler G, Middleton PG, Whlke M, Rocha V, Esendam B. Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood tranaplantation: a retrospective analysise. Transplantation 2002; 47(8): 1167-75.

15- Bertinetto FE, DallOmo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M. Role of none HLA genitic polymorphism in graft versus host disease after hematopoietic tmcell.. Immunogenetics 2006; 33 (5): 375-84.

16- Katagiri T, Shiobara S, Nakoa S, Wakano M, Muranaka E. Mismatch of minor histocompatibility antigen contributes to a graft versus leukemia effect rather than to acute GVHD, resulting in long term survival after HLA-I dentical stem transplantation in japan. Bone Marrow Transplantation 2006; 38(10): 681-6.

17- Heinemann, Falko M, Ferencik, Stanisalv, Ottinger, Hellmut. impact of disparity minor histocompatibility antigens HA-1, CD31, and CD49b in hematopoietic stem cell transplantation of patients with choronic myelogenic leukemia with sibling and unrelated doners.Transplantation 2004; 77(7): 1103.

18- Goulmy E, Chiper O, Pool J, Blokland E. Minor histocompatibility antigens and bone marrow transplantation. New Eng biomed J 1996; 334(5): 323-4.

19- Mommaas B, Kamp S, Janine A. Identification of Minor Histocompatibility Antigen HA-1 Specific Cytotoxic T Cell for the Treatment of Leukemia After Allogenic Stem Cell. Transplantation Blood 1999; 94(12): 4374-6.

20- Nescie S, Buffi O, Iliesc A, Andeani M, Lucarell G. recipient mHags HA-1 disparity and aGVHD in thalasemic-transplanted patiens. Bone Marrow transplantion 2003; 31(7): 575-8.

21- Terlizzie SD, Zino E, Mazzi B, Magnani C, Tresoldi C. Therapeutic and Diagnostic Applications of Minor Histocompatibility Antigen HA-1 and HA-2 Disparites in Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Survey of Different Population. Biology of Blood and Marrow Transplantation 2006; 12 (1): 95-101.

Archive of SID

www.SID.ir

Relationship between HA-1 disparity and acute GVHD after hematopoietic stem cell transplanation

Shaiegan M.[1](PhD), Mohammadi S.[1](MS), Samiee Sh.[1](MS), Ali Moghaddam K.[2](MD), Babaiee Gh.[3](PhD), Ghashghaiee A.[2](MS), Rostami Sh.[2](MS), Khatami F.[2](MD), Azarkeivan A.[1](MD), Zolfaghari Anaraki S.[1](MD), Ataiee Z.[1](BS), Ghavamzadeh A.[2](MD)

[1] Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Tehran, Iran
[2] Hematology,Oncology and BMT Research Center of Shariati Hospital, Tehran, Iran
[3] Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

Abstract

Background and Objectives

It is suggested that HA-1 mismatching among hematopoietic stem cell recipients-donors be associated with acute graft-versus-host disease (aGVHD). So the aim of this study was to evaluate HA-1 frequency and examine the correlation between HA-1 disparity and GVHD patients who received transplantation from HLA-A2 identical siblings.

Materials and Methods

Extracted DNA samples were collected from 55 HLA-A2-positive donor-recipient pairs. All the patients received peripheral blood stem cell transplant (PSCT) from HLA-identical siblings. HA-1 was detected by SSP-PCR method. The HA-1 typing was performed using SSP method. Data were analyzed using Chi-square, Man withney and Z test with SPSS 11.5.

Results

Thirty patients showed to be GVHD I-IV and 25 pairs were without any GVHD signs. The frequency rates of HA-1R and HA-1H alleles in patients were 0.55 and 0.45, respectively; it showed no significant difference with the frequency rates (0.53 and 0.47) of this allels in donors ($p>0.05$). HA-1 disparity was detected in 8 out of the 55 donor/recipient pairs (14.5%). aGVHD (grades I-IV) was occurred in 6 of patients. Two patients with HA-1 disparity did not show any GVHD signs. X^2 test showed there was not any relationship between the incidence of acute graft-versus-host-disease (aGVHD) and HA-1 incompatibility in the patiens.

Conclusions

In spite of higher frequency of HA-1 disparity in GVHD+ group, our data did not reflect any significant association between HA-1 disparity and risk of acute GVHD.

Key words: Polymerase Chain Reaction, Graft- Versus – Host Disease, Minor Histocompatibility Antigens , Hematopoietic Stem Cell Transplantation
SJIBTO 2009; 6(1): 31-40

Received: 4 May 2008
Accepted:15 Nov 2008

Correspondence: Shaiegan M., PhD of Immunology, Assistant Professor of Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052194; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *m.shaiegan@ibto.ir*

Archive of SID
www.SID.ir