

بررسی مولکولی آنتی ژن نوتروفیلی - ۳ در برخی اهداکنندگان خون

فاطمه شاهین^۱، مژگان شایگان^۲، شهرام سمیعی^۳، بهناز بیات^۴، فاطمه نادعلی^۵، زهرا عطایی^۶،
محمد صیادی^۱، آرزیتا چگینی^۷

چکیده

سابقه و هدف

آلوانتی ژن های نوتروفیلی در بسیاری از عوارض انتقال خون، نظیر آسیب حاد ریوی پس از انتقال خون، مقاومت به تزریق گرانولوسیت ها و واکنش های تبزای انتقال خون دخالت دارند. به علت عدم وجود گزارش وفور این آنتی ژن ها، هدف این مطالعه بررسی فراوانی HNA-3a و HNA-3b در برخی اهداکنندگان خون ساکن تهران بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه توصیفی، از تعداد ۱۱۰ اهداکننده خون مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون استان تهران، نمونه خون حاوی ماده ضد انعقادی EDTA دریافت شد. DNA با استفاده از ستون فیلتردار سیلیکایی استخراج شد. برای بررسی HNA-3a و HNA-3b از روش PCR-SSP استفاده گردید و وفور ژنی آنتی ژن های HNA-3a و HNA-3b با استفاده از معادله هاردی واینبرگ محاسبه شد.

یافته ها

وفور ژنی HNA-3a و HNA-3b به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ حاصل گردید که با معادله هاردی واینبرگ تطابق دارد. از نظر فنوتیپی: ۱۰۳ نفر (۹۳/۶٪) دارای HNA-3a، ۷ نفر (۶/۴٪) فاقد این آنتی ژن و ۵۰ نفر (۴۵/۵٪) دارای HNA-3b و ۶۰ نفر (۵۴/۵٪) فاقد این آنتی ژن بودند. تفاوتی از نظر وفور ژنی و آنتی ژنی بین دو جنس مشاهده نشد.

نتیجه گیری

وفور ژنی HNA-3a و HNA-3b به دست آمده در این مطالعه با سایر مطالعه های انجام شده در آلمان و ترکیه مشابه می باشد.

کلمات کلیدی: آنتی ژن HNA-3a انسانی، اهداکنندگان خون، EDTA

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۷

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۱

۱- کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- PhD ایمونولوژی - مؤسسه ایمونولوژی بالینی و طب انتقال خون Justus Liebig دانشگاه Giessen - آلمان

۵- PhD خون شناسی و بانک خون - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

۶- دانشجوی کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۷- متخصص بیوشیمی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی انسان (Human Neutrophil Antigens= HNAs) و آنتی‌بادی‌های مربوطه و عدم شباهت آن‌ها بین اهداکننده و دریافت کننده خون و یا مادر و جنین، منجر به وضعیت‌های بالینی مختلفی مثل نوتروپنی ایمیون‌نوزادان (ANN: Alloimmune neonatal neutropenia)، آسیب حاد ریوی مربوط به انتقال خون (TRALI: Transfusion Related Acute Lung Injury)، مقاومت به تزریق گرانولوسیت، واکنش‌های تبزای انتقال خون و نوتروپنی پس از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز می‌شود. این آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها در بروز نوتروپنی دارویی و اتوایمیون نیز دخالت دارند.

HNAs مختلف از نظر ساختمانی و عملکرد متفاوت می‌باشند (۵-۱). هفت آنتی‌ژن در ۵ گروه یا سیستم مشخص شده‌اند، که طبق نام‌گذاری منطبق بر مقررات (International Society of Blood Transfusion) ISBT نام‌گذاری و تقسیم شده‌اند (۱) (جدول ۱). در سال ۲۰۱۳ نیز HNA-1d توسط خانم رایلی معرفی شد که در نوتروپنی ایمیون نوزادان نقش دارد (۶).

پلی‌مورفیسم آلوانتی‌ژن‌های نوتروفیلی HNA، باعث بسیاری از اختلالات بالینی آلوایمیون و اتوایمیون می‌شود (۷). نقش آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی علاوه بر ایجاد ناسازگاری‌ها، اعمال طبیعی نوتروفیل‌ها مثل پاکسازی کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی به عنوان بخشی از قسمت ثابت گیرنده ایمنوگلوبولین Fc Gamma Receptor می‌باشد. اما هنوز مشخص نشده که آیا پلی‌مورفیسم این آنتی‌ژن‌ها نیز در عملکرد نوتروفیل‌ها اثری دارد یا خیر؟ (۸).

فنوتیپ HNA null در بعضی از بیماران باعث تمایل به عفونت‌های مکرر و بیماری‌های اتوایمیون می‌شود (۹).

آنتی‌ژن HNA-3a در سال ۱۹۶۴ به وسیله لیوون معرفی شد. او مطرح نمود که این آنتی‌ژن روی گلیکوپروتئین ۷۰ تا ۹۰ کیلو دالتون CTL-2 (Choline Transporter-Like peptide) وجود دارد. این آنتی‌ژن قبلاً HNA-5b اطلاق می‌شد (۱۰-۱۲). HNA-3a و HNA-3b حاصل پلی‌مورفیسم منفرد نوکلئوتیدی (Single Nucleotide = SNP Polymorphism) ژن SLC44A2 کدکننده CTL-2 روی

کروموزوم 19p13.1 می‌باشند که طی آن گوانین موقعیت ۴۶۱ با آدنین جایگزین شده و باعث تغییری در CTL-2 گلیکوپروتئینی در عرض غشاء می‌شود (۱۴، ۱۳). در این تغییر آرژنین موقعیت ۱۵۴ (در HNA-3a) به گلوتامین (در HNA-3b) تبدیل می‌شود. HNA-3 در نوتروفیل‌های روی لنفوسیت‌ها، پلاکت‌ها، سلول‌های اندوتلیال، کلیه، طحال، سلول‌های جفت، منوسیت‌ها و بافت لنفاوی نیز دیده می‌شود (۱۵، ۱۲، ۱۱).

تصور می‌شود CTL-2 دارای ۱۰ قلمرو (domain) در عرض غشاء و ۵ قلمرو خارج سلولی است (۱۶). تعداد HNA-3a روی لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها برابر گزارش شده‌اند و تعداد این آنتی‌ژن‌ها در افراد هتروزیگوت به میزان ۵۰٪ از آنتی‌ژن‌های یک فرد هموزیگوت می‌باشند (۱۶). جایگزینی دیگری بین سیتوزین با تیمین در موقعیت ۱۵۳ در سطح نوکلئوتیدی، منجر به جابه‌جایی اسید آمینه لوسین با فنیل‌آلانین (در موقعیت ۴۵۷) شده که در اولین حلقه یا دومین خارجی پروتئین صورت می‌گیرد و اتصال به آنتی‌بادی و حتی تعیین ژنوتیپ را تحت تاثیر قرار داده و ممکن است منجر به عدم تعیین ژنوتیپ گردد (۱۴).

توزیع آلل‌های سیستم HNA در جمعیت‌های مختلف با استفاده از چندین روش تعیین ژنوتیپ بررسی شده است (۱۹-۱۷، ۵). بررسی فنوتیپی HNAs به روش‌های آگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس انجام می‌شود (۲۰، ۱۸). اما به دلیل نیاز به نوتروفیل‌های تازه، سختی دسترسی به آنتی‌بادی‌های مربوطه و دقت کمتر روش‌های سرولوژیک، امروزه این روش‌ها با روش‌های مولکولی جایگزین شده‌اند. در روش‌های مبتنی بر ایمونوفلورسانس برای بررسی فنوتیپی گرانولوسیت‌ها نیز دسترسی به آنتی‌بادی‌های ضد HNA (به ویژه HNA-3/4/5) مشکل است اما آنتی‌بادی‌های ضد HNA-1a/-1b/-2a به صورت تجاری و به روش فلوسیتومتری موجود هستند که روش اخیر نسبت به روش سرولوژیک سریع‌تر و ساده‌تر می‌باشد (۲۱، ۵-۱).

آنتی‌بادی‌های ضد HNA-1a و HNA-2a در بروز TRALI دخالت دارند اما آنتی‌بادی‌های ضد HNA-3 در

جدول ۱: ویژگی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی (۱۳)

گروه‌های آنتی‌ژنی	آنتی‌ژن‌ها	نام قبلی	CD مارکر	ژن کد کننده آلل	اهمیت بالینی
HNA-1	HNA-1a	NA1	FcγRIIIb/CD16b	FCGR3B*01	ANN,AIN,TRALI,ϕ
	HNA-1b	NA2	FcγRIIIb/CD16b	FCGR3B*02	
	HNA-1c	SH	FcγRIIIb/CD16b	FCGR3B*03	
HNA-2	HNA-2a	NB1	58-64 kDa/CD177	Unknown	ANN,AIN,TRALI Febrile transfusion reactions, drug- dependent neutropenia
HNA-3	HNA-3a	5b	CTL2/Unknown		ANN,TRALI, febrile transfusion reactions
	HNA-3b	5a	CTL2/Unknown		
HNA-4	HNA-4a	MART	CR3/CD11b (α M subunit)	ITGAM*01 (230G)	ANN
HNA-5	HNA-5a	OND	LFA-1/CD11a (α L subunit)	ITGAL*01 (2372G)	Unknown

کامل از ۱۱۰ نفر از اهداکنندگان خون مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون تهران در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA در حین نمونه‌گیری برای انجام آزمایش‌های غربالگری خون در حین اهدای خون، جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌ها در دمای محیط و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند و در فاصله ۲-۳ ساعت از نمونه‌گیری، استخراج DNA از گلبول‌های سفید موجود در بافی‌کوت (با استفاده از ستون فیلتردار سیلیکایی در کیت GeNet Bio محصول کشور کره) انجام شد. برای تعیین ژنوتیپ HNA-3a,3b از روش PCR-SSP استفاده گردید. دو لوله واکنش جداگانه، برای تعیین ژنوتیپ دو آلل مورد نظر HNA-3a,3b استفاده شد. توالی آغازگرها به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. حجم کلی محتوای واکنش، ۲۰ میکرولیتر (شامل ۶ میکرولیتر نمونه DNA، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش و نوکلئوتیدها و ۴ میکرولیتر از مخلوط آغازگرها و نوکلئوتیدها) در هر لوله بود. مخلوط آغازگرها شامل آغازگر مخصوص آلل (allele specific primer)، آغازگر مشترک دو آلل (common primer)، یک جفت آغازگر هورمون رشد (HGH یا Human Growth Hormon)، به عنوان کنترل مثبت واکنش PCR و dH₂O بود که مقدار مصرفی هر کدام بسته به غلظت نهایی مورد نظر برای آن آغازگر داشت. مقدار آنزیم DNA تک پلیمرز (۱۰۰۰ Units، روش) برای هر واکنش ۰/۳ میکرولیتر بود که به صورت کلی برای هر

بروز TRALI شدید منجر به مرگ، حتی در افراد سالم، مؤثر شناخته شده است (۲۲). دوران و رایلی بروز TRALI را ناشی از حضور آنتی‌بادی‌های HNA-3a در اهداکنندگان دانسته‌اند که انتقال این آنتی‌بادی‌ها می‌تواند منجر به مرگ و میر شود. اتصال آنتی‌بادی‌های HNA-3 منجر به تثبیت آنتی‌ژن HNA-3a، تغییر شکل فضایی آن و تجمع (آگلوتیناسیون) نوتروفیل‌ها می‌گردد که مرحله مهمی در بروز این عارضه است (۲۴، ۲۳). ایمن شدن زنان اهداکننده خون با فنوتیپ 3b، HNA-3b علیه HNA-3a طی حاملگی ۰/۷٪ گزارش شده است (۲۵). تعیین ژنوتیپ آنتی‌ژن‌های HNA-3a تا سال ۲۰۰۷ و تعیین ویژگی HNA-3b در سال ۲۰۱۰ مقدور شدند (۲۱، ۱۲). در یک مطالعه وفور آنتی‌ژن HNA-3a برابر ۰/۷۹۲ و وفور آنتی‌ژن HNA-3b معادل ۰/۲۰۷ اعلام شد، اما در مطالعه‌های مختلف در جمعیت‌های گوناگون، فراوانی متفاوتی از آن‌ها گزارش شده است (۳۶-۲۶، ۱۹، ۱۲، ۴). با توجه به نقش این آنتی‌ژن‌ها در تحریک ایجاد آنتی‌بادی و دخالت در برخی عوارض انتقال خون و عدم وجود اطلاعات در این زمینه در اهداکنندگان خون در کشور، هدف اصلی این مطالعه به عنوان قدم اول، بررسی وفور آنتی‌ژن‌های HNA-3a، -3b در برخی اهداکنندگان خون به روش PCR-SSP (Sequence-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. ۵ mL خون

جدول ۲: توالی آغازگرها، اندازه، غلظت نهایی و اندازه مورد انتظار برای محصولات تکثیری در هر آنتی ژن

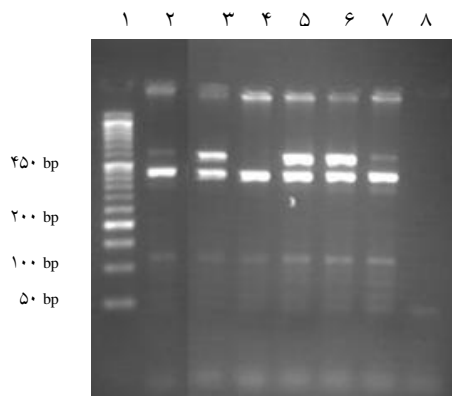
سیستم	آنتی ژن	اندازه (bp)	غلظت نهایی (μM)	توالی	اندازه محصول (bp)
HNA-3	3a پیش برنده	۱۸		5' AGTGGCTGAGGTGCTTCG 3'	۶۰۱
	3b پیش برنده	۱۹	۱	5' GAGTGGCTGAGGTGCTTCA 3'	
	معکوس	۱۸		5' ATCGCCATGGCAATGACCA 3'	
HGH	پیش برنده	۲۲	۰/۱۲۵	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	۴۳۴
	معکوس	۲۹		5' CCACTCACGGATTTCGTGTGTTTC 3'	

دوره واکنش محاسبه گردید و در مخلوط واکنش اضافه شد. مخلوط واکنش شامل: ۱۰ میکرولیتر از Master Mix ۲ برای هر لوله واکنش می باشد. غلظت نهایی $MgCl_2$ در همه واکنش ها ۱/۵ میکرومولار در نظر گرفته شد. Master Mix دست ساز در آزمایشگاه کیت سازی آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون ایران است و پس از بررسی های لازم غلظت و ترکیب آن مشخص شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مراحل PCR زیر انجام شد: (۳۵ سیکل: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۱ سیکل: ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه). پس از انجام مراحل تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و ترانس ایلومیناتور UV مشاهده و بررسی شدند (جدول ۲). غلظت آغازگرهای HGH که به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش لحاظ شده اند طوری محاسبه گردیده که کمتر از آغازگرهای آنتی ژن های نوتروفیلی باشند و لذا زمانی که تکثیر آنتی ژن های نوتروفیلی به صورت مطلوب انجام شود، تکثیر ژن HGH هم انجام می شود و رقابت نمی کنند، در نتیجه وجود باندی از HGH به عنوان کنترل داخلی تایید کننده صحیح بودن روند آزمایش و مواد مورد استفاده می باشد. در مقابل آن وجود باند واضح دیگر با اندازه bp ۶۰۱، دلیل حضور آنتی ژن نوتروفیلی است. در صورت فقدان چنین باندی، تنها در حالتی جواب را منفی و به عنوان عدم حضور آلل تلقی می کنیم که تکثیر ژن HGH

صورت گرفته و باندی به اندازه bp ۴۳۴ در ردیف مشاهده شود. حضور این باند به تنهایی به معنای انجام واکنش تکثیر و عدم حضور آلل مربوطه است. باندهای مربوط به آلل ها با استفاده از سایز مارکر و مقایسه آن با باند موجود در هر ردیف تشخیص داده شدند. با مشاهده یا عدم مشاهده باند مورد نظر، موارد مثبت و منفی یادداشت شده و سپس وفور موارد مشاهده شده و مطابقت آن با قانون هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون آماری χ^2 بررسی گردید. در صورت کمتر بودن p از ۰/۰۵، یعنی وفور موارد مشاهده شده با قانون هاردی واینبرگ تطابق ندارد اما در صورت عدم اختلاف، یعنی موارد مشاهده شده با قانون هاردی واینبرگ مطابق دارد و با وارد کردن فراوانی آللی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت در محاسبه گر هاردی واینبرگ، وفور آلل های a و b برای HNA-3 به دست می آیند. برای مقایسه فراوانی نسبی ژن ها در جمعیت های مختلف از آزمون کای دو استفاده شد.

یافته ها

نمونه های خون کامل از ۱۱۰ اهداکننده خون مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون استان تهران (مرکز وصال) در محدوده سنی ۱۹ الی ۶۴ سال ($43/57 \pm 10$) شامل ۶ زن ($5/45$) و ۱۰۴ مرد ($94/55$)، در این مطالعه ارزیابی شدند. ۱۰۳ نفر ($93/6$) دارای HNA-3a، ۷ نفر ($6/4$) فاقد این آنتی ژن و ۵۰ نفر ($45/5$) دارای HNA-3b و ۶۰ نفر ($54/5$) فاقد این آنتی ژن بودند (جدول ۳).



شکل ۱-ب: نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP مربوط به ژن HNA-3b: ستون ۸ کنترل منفی بدون DNA می باشد. باند ۴۳ bp مربوط به HGH می باشد که در تمام ستون‌ها مثبت شده است. باند ۶۰۱ bp مربوط به HNA-3ab می باشد که در تمام ستون‌ها به جز ۴ مشاهده می شود. ستون اول سایز مارکر ۵۰ bp است.

آن چه مهم است این است که در شش فرد مؤنث مورد بررسی در این مطالعه، مواردی از هموزیگوت HNA-3b/3b مشاهده نگردید. نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP برای آلل‌های ۳b، HNA-3a در شکل ۱ (a و b) نشان داده شده است.

بحث

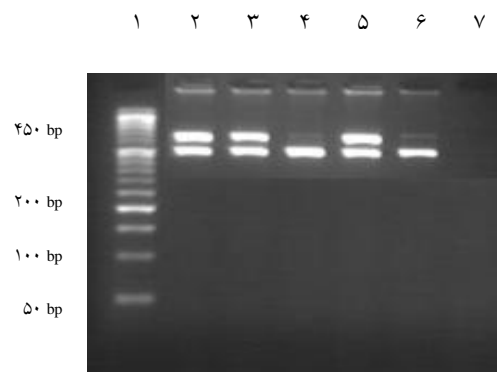
نتایج این بررسی نشان داد که وفور ژنی HNA-3a برابر ۰/۷۴ و فراوانی ژنی HNA-3b معادل ۰/۲۶ می باشد. نورسیا و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی شیوع فنوتیپ‌های -4a، -3a، -2، HNA-1a، -1b در ۱۰۰ فرد برزیلی به روش GIFT به وسیله فلوسیتومتری پرداختند و نتایج نشان‌دهنده فراوانی فنوتیپ HNA-3a، ۹۵٪ بود (۳۱). در حالی که فنوتیپ HNA-3a در ۱۰۳ نفر (۹۳/۶٪) از افراد مطالعه حاضر مشاهده شد و این اختلاف بین دو جمعیت معنادار نبود.

هاک بی و همکاران در سال ۲۰۱۱ شیوع -۳، -۴، -۵، HNA-1 را در ۱۱۹ اهداکننده خون در آلمان و ۱۱۸ اهداکننده ترک مهاجر به آلمان، به وسیله روش PCR-SSP بررسی و نتایج را با هم مقایسه نمودند. فراوانی در آلمانی‌ها برای HNA-3a معادل ۰/۷۴۴ و برای HNA-3b

جدول ۳: جدول دوگانه HNA-3a*HNA-3b

جمع	HNA-3b		آلل	
	-	+	-	HNA-3a
۷	HNA-3a ⁻ 3a ⁻	HNA-3a ⁻ 3b ⁺	-	HNA-3a
	۰	۷		
۱۰۳	HNA-3a ⁺ 3a ⁺	HNA-3a ⁺ 3b ⁺	+	
	۶۰	۴۳		
۱۱۰	۶۰	۵۰	جمع	

مشخص شد از ۱۰۳ نفری که HNA-3a را دارند، ۴۳ نفر (۳۹/۱٪) هتروزیگوت HNA-3a/3b (شامل ۳ زن و ۴۰ مرد)، ۶۰ نفر (۵۴/۵٪) هموزیگوت HNA-3a/3a (شامل ۳ زن و ۵۷ مرد) و از ۵۰ نفری که HNA-3b را دارند، ۷ نفر (۶/۴٪) هموزیگوت HNA-3b/3b (همگی مرد) بودند. وفور موارد مشاهده شده به علت بزرگتر بودن عدد p از ۰/۰۵، با قانون هاردی واینبرگ تطابق داشت و لذا طبق معادله هاردی واینبرگ، فراوانی ژنی HNA-3a برابر ۰/۷۴ و فراوانی ژنی HNA-3b برابر ۰/۲۶ در جمعیت مورد مطالعه بود. تفاوتی بین وفور آنتی‌ژن‌ها بین دو جنس مشاهده نشد (فراوانی ژنی HNA-3a برابر ۰/۷۳ در مردان و ۰/۷۵ در زنان و HNA-3b برابر ۰/۲۷ در مردان و ۰/۲۵ در زنان مشاهده شدند).



شکل ۱- a) نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP مربوط به ژن HNA-3a: ستون ۷ کنترل منفی بدون DNA می باشد. باند 434bp مربوط به HGH است که در تمام ستون‌ها مثبت شده است. باند 601bp مربوط به HNA-3a می باشد که در تمام ستون‌ها به جز ۴ مشاهده می شود. ستون اول سایز مارکر ۵۰ bp است.

Luminex bead assay انجام شد و فراوانی HNA-3a و HNA-3b به ترتیب ۰/۷۶۸ و ۰/۲۳۲ به دست آمد (۳۴). چانگسری و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی شیوع ۵-، ۴-، ۳-، ۱-HNA در ۳۰۰ نفر از اهداکنندگان خون در محدوده سنی ۱۸ تا ۵۸ سال در تایلند پرداختند. برای ۴-، ۳-، ۱-HNA از روش PCR-SSP و برای ۵-HNA از روش PCR-RFLP بهره بردند. نتایج این مطالعه وفور ۰/۴۹ را برای HNA-3a و ۰/۵۱ را برای HNA-3b نشان داد (۳۵). جدول ۴ نتایج مقایسه وفور فراوانی مشاهده شده این ژن‌ها در جمعیت مورد مطالعه با جمعیت‌های آلمانی، ترکیه‌ای، ژاپنی، تایلندی و انگلیسی را نشان می‌دهد. مقایسه وفور 3b، 3a-HNA (۰/۲۶، ۰/۷۴) در جمعیت مورد مطالعه در تحقیق حاضر با مطالعه‌های قبلی در جوامع دیگر نشان می‌دهد که به فراوانی این دو آلل در آلمان، ترکیه، انگلیس شبیه و با وفور گزارش شده این آلل‌ها در تایلند و ژاپن متفاوت به نظر می‌رسند. اما با وفور این آلل‌ها در چین، این اختلاف با $p < 0/1$ معنادار است. گزارش‌هایی نیز از موارد HNA-3a/3b وجود دارد، که در واقع به علت وقوع موتاسیون در موقعیت ۴۵۷ به نظر می‌رسد که بر تعیین ژنوتیپ اثر می‌کند (۳۸، ۳۷).

برابر ۰/۲۵ و در جمعیت ترکیه ۰/۷۳۷ برای HNA-3a و ۰/۲۶۳ برای HNA-3b مشاهده شد که تفاوت چشمگیر آماری بین دو گروه مشاهده نشد و نتایج حاکی از آن بود که رد و بدل کردن خون و فرآورده‌های آن بین این افراد دو کشور، باعث گسترش آلوانتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی نمی‌شود و در حاملگی‌ها طی ازدواج بین زوج‌هایی از این دو کشور، نیازی به غربالگری خاصی برای HNA ندارد (۳۲).

ماتسوهاشی و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی شیوع ۵-، ۴-، ۳-، ۲-، ۱-HNA در ۵۷۰ فرد سالم در ژاپن با استفاده از روش‌های مولکولی و سرولوژیک پرداختند. ژنوتیپ ۱-HNA به روش PCR-rSSOP (polymerase chain reaction-reverse sequence specific - oligonucleotide probes) ارزیابی شد و ۵، ۴، ۳-HNA به روش PCR-SSP با کمی تغییر بررسی شدند. ۲-HNA با روش GIFT در ۳۰۰ ژاپنی بررسی شد که فراوانی 3a و 3b به ترتیب ۰/۶۵۴ و ۰/۳۴۶ بود (۳۳). کاردوسو و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی شیوع ۵-، ۴-، ۳-، ۱-HNA در ۱۴۰ سفیدپوست اهداکننده خون در انگلستان پرداختند، بررسی با استفاده از روش multiplex

جدول ۴: مقایسه وفور ژنی HNA-3a/3b بین جمعیت‌های مختلف

کشور	سال	تعداد نمونه / روش کار	فراوانی نسبی HNA-3a	فراوانی نسبی HNA-3b	p value
آلمان	۲۰۱۱ (۳۳)	۱۱۹ آلمانی و ۱۱۸ ترکیه PCR-SSP	۰/۷۴۴	۰/۲۵۶	۰/۹۲
			۰/۷۳۷	۰/۲۶۳	۰/۸۹
ژاپن	۲۰۱۲ (۳۴)	۵۷۰ PCR-SSOP	۰/۶۵۴	۰/۳۴۶	۰/۰۳۹
انگلستان	۲۰۱۳ (۳۵)	۱۴۰ Multiplex Luminex DNA base assay	۰/۷۶۸	۰/۲۳۲	۰/۷۳
تایلند	۲۰۱۳ (۳۶)	۳۰۰ PCR-RFLP	۰/۴۹	۰/۵۱	۰/۰۰۰۱
چین	۲۰۱۳ (۳۷)	۴۰۰ PCR-SSP	۰/۶۵۴	۰/۳۴۶	۰/۰۵۹
مطالعه حاضر	۲۰۱۵	۱۱۰ PCR-SSP	۰/۷۴	۰/۲۶	-

چنین در مطالعه حاضر مواردی نیز از HNA-3b نول مشاهده نشدند. با توجه به گزارش مواردی از هموزیگوت HNA-3b/3b در برخی افراد و وفور HNA-3a، بررسی آنتی‌بادی‌های HNA-3a در موارد کراس‌مچ مثبت و قبل از تزریق مفید به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از یافته‌های پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب در مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد.

در سال ۲۰۰۹ طی گزارشی در مورد افراد غیر خویشاوند با فنوتیپ منفی HNA-3a، مطرح شد که این افراد دارای SNP (پلی‌مورفیسم نوکلئوتید منفرد) در نوکلئوتید ۵۴۲ ژن *SLC44A2* کدکننده CTL-2 می‌باشند (۳۸). برای صحت اطمینان از موارد منفی، بررسی توالی نوکلئوتیدی توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مواردی از HNA-3b/3b در بین زنان مورد مطالعه یافت نشد اما به دلیل تعداد اندک آن‌ها توصیه می‌شود در تعداد بیشتری از زنان، بررسی انجام شود. هم

References :

- 1- Yasui K, Miyazaki T, Matsuyama N, Kojima Y, Furuta RA, Fujisawa J, *et al.* Stabishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b, and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. *Transfusion* 2007; 47(3): 478-85
- 2- Bux J. Granulocyte immunology. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113(20-21): 799-805.
- 3- Bux J. Molecular nature of granulocyte antigens. *Transfus Clin Biol* 2001; 8(3): 242-7.
- 4- Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* 1995; 35(1): 54-7.
- 5- Bux J. Human neutrophil alloantigens. *Vox Sang* 2008; 94(4): 277-85.
- 6- Reil A, Sachs UJ, Siahianidou T, Flesch BK, Bux J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fcγ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion* 2013; 53(10): 2145-51.
- 7- McCullough J, Clay ME, Stroneck DE. Granulocyte allogantigen systems and their clinical significance. In: Nance ST. *Alloimmunity*. Bethesda (MD): American Association of Blood Bank; 1993. p. 49-82.
- 8- Hamburger MI, Lawley TJ, Kimberly RP, Plotz PH, Frank MM. A serial study of splenic reticuloendothelial system FC receptor functional activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(1): 48-52.
- 9- De Haas M, Kleijer M, Van Zwieten R, Roos D, Von dem Borne AEGK. Neutrophil FcγRIIIb deficiency, nature and clinical consequences: A study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 1995; 86(6): 2403-13.
- 10- Moritz E, Norcia AM, Cardone JD, Kuwano ST, Chiba AK, *et al.* Human neutrophil alloantigens systems. *An Acad Bras Cienc* 2009; 81(3): 559-69.
- 11- Stroneck D. Granulocyte antigens and antibody detection. *Vox Sang* 2004; 87(Suppl 1): S91-4.
- 12- Fung YL, Minchinton RM. The fundamentals of neutrophil antigen and antibody investigations. *ISBT Science Series* 2011; 6(2): 381-6.
- 13- Stroneck DF, Clay M. Is it time to reconsider neutrophil antibody testing of platelet donors? *Transfusion* 2011; 51(1): 2-4.
- 14- Veldhuisen B, Porcelijn L, van der Schoot CE, De Haas M. Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). *Transfus Apher Sci* 2014; 50(2): 189-99.
- 15- Lucas G. Human Platelet Antigens (HPA) and Human Neutrophil Antigens (HNA) and Their Clinical Significance. In: Knight R. *Transfusion and Transplantation science*. USA: Oxford University Press; 2013. p. 187-216.
- 16- Curtis BR, Cox NJ, Sullivan MJ, Konkashbaev A, Bowens A, *et al.* The neutrophil alloantigen HNA-3a (5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an RQ154 amino acid substitution. *Blood* 2010; 115(10): 2073-6.
- 17- Han TH, Han KS. Gene frequencies of human neutrophil antigens 4a and 5a in the Korean population. *Korean J Lab Med* 2006; 26(2): 114-8.
- 18- Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM, Vieira-Filho JP. Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping. *Transfusion* 2006; 46(9): 1515-20.
- 19- Nielsen KR, Koelbaek MD, Varming K, Baech J, Steffensen R. Frequencies of HNA-1, HNA-3, HNA-4, and HNA-5 in the Danish and Zambian populations determined using a novel TaqMan real time polymerase chain reaction method. *Tissue Antigens* 2012; 80(3): 249-53.
- 20- Taniguchi K, Kaneyasu C, Okamura M, Kobayashi M. Influence of monoclonal antibodies to human neutrophil antigens, HNA-1a/b and HNA-2a on phagocytosis. *Rinsho Byori* 2007; 55(11): 996-1001.
- 21- Han TH, Chey MJ, Han KS. A case of neonatal

- alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-1a (HNA-1a) antibody. *J Korean Med Sci* 2006; 21(2): 351-4.
- 22- Storch EK, Hillyer CD, Shaz BH. Spotlight on pathogenesis of TRALI: HNA-3a (CTL2) antibodies. *Blood* 2014; 124(12): 1868-72.
- 23- Schubert N, Berthold T, Muschter S, Wesche J, Füll B, Reil A, *et al.* Human neutrophil antigen-3a antibodies induce neutrophil aggregation in a plasma-free medium. *Blood Transfus* 2013; 11(4): 541-7.
- 24- Gottschall J, Triulzi D, Kakaiya R, Carrick D, Roback JD, Carey P, *et al.* Human neutrophil antibodies in a blood donor population: a lookback study. *Vox Sang* 2013; 104(2): 166-70.
- 25- Day S, Lucas G, Parsons J, Hopkins K, Ravanan R. Possible role of HNA-3a antibodies in graft rejection following kidney transplantation. 25th British Society for Histocompatibility and Immunogenetics Conference, Manchester, UK, 3rd and 4th September 2014. p. 419.
- 26- Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of Neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction sequencespecific primers. *Transfusion* 1996; 36(10): 895-9.
- 27- Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G, Bux J. HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c(NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese. *Tissue Antigens* 2000; 56(2): 143-8.
- 28- Abid S, Zili M, Bouzid L, Kibech R, Foudhaili N, Joudi K, *et al.* Gene frequencies of human neutrophil antigens in the Tunisian blood donors and Berbers. *Tissue Antigens* 2001; 58(2): 90-2.
- 29- Flesch BK, Doose S, Siebert R, Ntambi E, Neppert J. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a,-1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transfusion* 2002; 42(4): 469-75.
- 30- Al-Sheikh IH, Al-Khalifa MA, Rahi AS. Frequency of neutrophil alloantigens by polymerase chain reaction. *Saudi Med J* 2002; 23(5): 548-51.
- 31- Norcia AM, Sugano EY, Chiba AK, Moritz E, Guirao FP, Yamamoto M, *et al.* Human neutrophil alloantigen -1a, -1b, -2, -3a and -4a frequencies in Brazilians. *Tissue Antigens* 2009; 74(5): 404-7.
- 32- Hauck B, Philipp A, Eckstein R, Ott S, Zimmermann R, Dengler T, *et al.* Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent. *Tissue Antigens* 2011; 78(6): 416-20.
- 33- Matsushashi M, Tsuno NH, Kawabata M, Mishima Y, Okochi N, Santoso S, *et al.* The frequencies of human neutrophil alloantigens among the Japanese population. *Tissue Antigens* 2012; 80(4): 336-40.
- 34- Cardoso SP, Chong W, Lucas G, Green A, Navarrete C. Determination of human neutrophil antigen-1, -3, -4 and -5 allele frequencies in English Caucasoid blood donors using a multiplex fluorescent DNAbased assay. *Vox Sang* 2013; 105(1): 65-72.
- 35- Changsri K, Tobunluepop P, Songthammawat D, Apornsuwan T, Kaset C. Human neutrophil alloantigen genotype frequencies in Thai blood donors. *Blood Transfus* 2014; 12 Suppl 1: s286-91.
- 36- Junjun He J, Zhang W, Wang W, Chen N2, Han Z, *et al.* Genotyping of human neutrophil antigens by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Blood Transfus* 2014; 12 Suppl 1: s292-8.
- 37- Huvad MJ, Schmid P, Stroncek DF, Flegel WA. Frequencies of *SLC44A2* alleles encoding human neutrophil antigen-3 (HNA-3) variants in the African American population. *Transfusion* 2012; 52(5): 1106-11.
- 38- Nelson R. Study reveals new insight into transfusion-related acute lung injury. American Society of Hematology (ASH) 51st Annual Meeting; 2009. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/714149>.

Original Article

Molecular evaluation of Human Neutrophil Antigen (HNA-3) in some blood donors

*Shahin F.¹, Shaiegan M.¹, Samiee Sh.¹, Bayat B.², Nadali F.³, Ataie Z.¹
Sayyadi M.¹, Chegini A.¹*

¹*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

²*Institute for Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Justus Liebig University, Giessen, Germany*

³*School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Neutrophil alloantigens are involved in several blood transfusion reactions including transfusion related acute lung injury (TRALI), refractoriness to granulocyte transfusions and febrile transfusion reactions (FNHTRs). Due to lack of reports on neutrophil antigens, we aimed to detect the frequency rates of HNA-3a and HNA-3b antigens in some blood donors living in Tehran.

Materials and Methods

Blood samples were collected in EDTA (anticoagulant) containing tubes from 110 blood donors having referred to Tehran Blood Center. DNA was extracted by silica filtered columns. PCR-SSP was used for evaluation of HNA-3a, HNA-3b. The gene frequency rates of HNA 3a and HNA-3b antigens were calculated by Hardy Weinberg equilibrium.

Results

The gene frequencies of HNA-3a, HNA-3b were 0.74 and 0.26, respectively showing consistency with the Hardy-Weinberg equilibrium. HNA-3a phenotypic frequency was found in 103 (93.6%) blood donors while 7 (6.4%) showed lacking it. HNA-3b was found in 50 (45.5%) blood donors while 60 (54.5%) lacking. There was not found any differences in gene and antigene frequency rates between the two genders.

Conclusions

The frequencies of HNA-3a and -3b were similar to those found in the previous study conducted on German and Turkish populations.

Key words: HNA-3a antigen, human, Blood Donors, EDTA

Received: 28 Nov 2015

Accepted: 30 Apr 2016

Correspondence: Shaiegan M., PhD of Immunology, Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601564; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: M.Shaiegan@ibto.ir