خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۲ تابستان ۹۶ (۹۱-۸۴)

مقاله پژوهشی

فراوانی آللی آنتی‌ژن نوتروفیلی پنج (HNA-5) در اهداکنندگان خون تبریز

عطیه خسروی[۱]، کریم شمس اسنجان[۲]، مژگان شایگان[۳]، شهرام سمیعی[۴]، زهرا عطایی کچویی[۵]، مریم عبدالهی[۶]، مهناز کواری[۶]، محبوبه شفیعی الماسیان[۷]، پریسا حسین‌زاده[۷]

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی انسانی، شامل ۵ سیستم آنتی‌ژنی است که بر روی غشای گلیکوپروتئینی گلبول‌های سفید قرار دارند. هدف از مطالعه، اطلاع از وفور آللی HNA در یک جمعیت به منظور تخمین شیوع بیماری‌های مربوط به HNA-5 بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، از ۱۹۰ اهداکننده آذری غیرخویشاوند ساکن تبریز مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون تبریز، نمونه خون دریافت شد. با استفاده از کیت تجاری پارس طوس، DNAها استخراج و سپس بررسی مولکولی HNA-5a^{-}(or HNA-5b) و HNA-5a^{+} به روش PCR-RFLP انجام شد. محصول PCR با استفاده از آنزیم Sdu1 Bsp1286I هضم شد. وفور ژنی آنتی‌ژن‌های HNA-5a وHNA-5b با استفاده از معادله هاردی واینبرگ محاسبه شد.

یافته‌ها

فنوتیپ‌های مشاهده شده HNA-5a(+/+) به ترتیب در ۹۳ نفر، HNA-5 (+/-) در ۱۰ نفر و HNA-5a (-/-) در ۸۷ نفر مشاهده گردیدند. فراوانی مشاهده شده با قانون هاردی واینبرگ تطابق داشت. فراوانی آللی HNA-5a طبق قانون مذکور برابر با ۰/۵۱ و HNA-5a^{-} (یا HNA5-b) برابر با ۰/۴۹ به دست آمد.

نتیجه گیری

فراوانی آلل‌های HNA-5 در این مطالعه، مشابه نتایج به دست آمده برای سایر جمعیت‌ها نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: نوتروفیل‌ها، PCR ، اهداکنندگان خون

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۹۶/ ۲/ ۴

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات ایمونولوژی ـ دانشگاه علوم پزشکی تبریز ـ تبریز ـ ایران
۲- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات خون و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- کارشناس زیست‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۶- کارشناس میکروبیولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۷- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تبریز ـ تبریز ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

مقدمه

نوتروفیل‌ها بیشترین جمعیت(۷۰٪-۴۰٪) گلبول‌های سفید را شامل می‌شوند(۱). آنتی‌ژن‌های اختصاصی نوتروفیلی که تحت عنوان آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی انسانی (Human Neutrophil Antigens) HNAs نامیده می‌شوند، شامل ۵ سیستم آنتی‌ژنی می‌باشند که در واقع گلیکوپروتئین‌های روی غشای پلاسمایی نوتروفیل‌ها هستند(۳، ۲). با توجه به قدرت ایمنی‌زایی این آنتی‌ژن‌ها، واکنش با آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن‌ها باعث ایجاد عوارض متعددی نظیر: آسیب حاد ریوی بعد از انتقال خون (Transfusion Related Acute Lung Injury) TRALI ، نوتروپنی اتوایمیون نوزادی، نوتروپنی دارویی و نوتروپنی ایمیون بعد از پیوند مغز استخوان در گیرنده می‌گردد(۳).

یکی از این سیستم‌های آنتی‌ژنی، سیستم HNA-5 با دو نوع آلل می‌باشد که روی زیر واحد αL (CD11a) از مجموعه مولکول چسبندگی اینتگرینی (LFA-1 ، CD11a/CD18) قرار گرفته است(۴). تفاوت بین دو شکل آنتی‌ژن‌های(onda) HNA-5a و HNA-5b به علت وجود یک موتاسیون در جایگاه ۷۹۱ (اگزون ۲۱ ، ایزوفرم ۱) یا جایگاه ۷۰۷ (اگزون ۱۹، ایزوفرم ۲) از نقطه شروع ATG می‌باشد(۴). به ترتیب رونوشت ایزوفرم ۱ و ۲ شامل bp ۵۲۲۶ (۱۱۷۰ اسید آمینه) و bp ۴۹۷۴ (۱۰۸۶ اسید آمینه) می‌باشد. HNA-5a به وسیله یک SNP در موقعیت G۲۴۶۶C و جایگزینی آرژنین با تریونین(Thr ۷۶۶ Arg) ایجاد می‌شود(۶، ۵). زیر واحد αLβ2 اختصاصی نوتروفیل‌ها است و واکنش‌ها و تبادلات داخل سلولی بین لکوسیت‌ها را تسهیل می‌کند(۶). آنتی‌بادی HNA-5 در بیماران مبتلا به آنمی آپلاستیک با دریافت چند بار خون پیدا شده و این افراد در پیوند پوست با HLA ناسازگار، بقای طولانی قابل توجهی را نشان داده‌اند. بنابراین ممکن است آنتی‌بادی‌های HNA-5a مانع میانکنش بین لکوسیت‌ها در بافت پیوندی و در نتیجه تاخیر در پس زدن بافت گردند(۶). وفور ژنوتیپی HNA-5a در جمعیت‌های مختلف در محدوده ۷۹٪ الی ۸۸٪ متفاوت گزارش شده است(۷).

با توجه به عدم وجود گزارش منتشر شده از وفور ژنی و آللی سیستم HNA-5 ، در این مطالعه فراوانی آلل‌های آن به روش PCR-RFLP در بین ۱۹۰ اهداکننده خون ساکن شهر تبریز گزارش می‌شوند. در این روش بعد از تکثیر توالی مورد نظر، از آنزیم(Bsp1286I) Sdu1 استفاده شد. پس از هضم توسط آنزیم، در صورت وجود ژن *HNA-5a*، توالی مورد نظر توسط آنزیم هضم شده و دو باند bp ۶۵ و bp ۱۳۶ را ایجاد می‌کند اما در صورت عدم وجود این ژن، روی ژل یک باند bp ۲۰۱ مشاهده می‌شود(۸). بدین وسیله افراد هتروزیگوت و هموزیگوت مشخص می‌شوند و شیوع بیماری‌های مربوط به HNA-5 قابل تخمین است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی بود. از ۲۱۴ اهداکننده غیرخویشاوند خون با قومیت آذری در پایگاه انتقال خون شهر تبریز در استان آذربایجان شرقی، نمونه خون کامل وریدی به حجم ۳ میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ، در حین نمونه‌گیری برای انجام آزمایش‌های غربالگری خون جمع‌آوری شد که با توجه به عدم مناسب بودن کیفیت برخی نمونه‌ها، ۱۹۰ نفر مورد ارزیابی نهایی قرار گرفتند. قبل از نمونه‌گیری، از اهداکنندگان خواسته شده تا فرم رضایت‌مندی را پر کنند و مقاله دارای کد اخلاق(IR-TMI-REC-1393-10) می‌باشد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام شد. اطلاعات مورد نیاز از قبیل سن، جنسیت، تعداد بارداری زنان، گروه خونی و نژاد افراد از اهداکنندگان ثبت شدند. بعد از نمونه‌گیری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری پارس طوس(ستون‌های فیلتردار سیلیکایی) و طبق بروشور کیت انجام شد. به طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر از آنزیم پروتئیناز K (PK) با ۲۰۰ میکرولیتر از خون کامل و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات(PB) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از absolute ethanol به ویال، مجدداً ۱۰ ثانیه میکروفیوژ شد. بعد از چرخش سریع (quick spin)، محتوای لیزات در یک ستون فیلتردار ریخته شده و ۱ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از دوبار شستشو با محلول‌های شستشوی پارس طوس(PW1 و PW2) نمونه‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول الوشن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

جدول ۱: توالی آغازگرها، اندازه، غلظت نهایی و اندازه مورد انتظار برای محصولات تکثیری در هر آنتی‌ژن

سیستم	آنتی‌ژن	غلظت نهایی (µM)	توالی	اندازه محصول
HNA-5	پیش برنده 5a	۱	5'CTTCAGCATCTCCACCTTGC3'	۲۰۱ bp
	معکوس 5a	۱	5'TTCTGATATTCCCCACCCTGA3'	۲۰۱ bp
HGH	پیش برنده	۰/۲۵	5'TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA3'	۴۳۴ bp
	معکوس	۰/۲۵	5'CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC3'	۴۳۴ bp

جدول ۲: تغییرات دما و زمان در این مطالعه

مرحله	Activation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Elongation	پایانی
زمان (دقیقه/ثانیه)	۱۰ دقیقه	۲۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۱۰ دقیقه	۴ دقیقه
دما (°C)	۹۵	۹۴	۵۷	۷۴	۷۴	۴
تعداد چرخه	۱		۳۰		۱	۱

پارس طوس(PE) انکوبه شدند. نهایتاً DNA با ۵ دقیقه سانتریفیوژ از فیلتر خارج و جمع‌آوری گردید.

با توجه به این که نسبت A۲۶۰/۲۸۰ به عنوان درجه خلوص DNA و کنترل کیفیت DNA استخراج شده با محدوده ۱/۹–۱/۷ نانومتر مطرح است، بنابراین کنترل کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ biowave II WPA جذب نوری در طول موج‌های ۲۳۰ نانومتر،۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر و نسبت‌های آن‌ها قرائت شد(۹). از ۲۱۴ نمونه، ۱۹۰ نمونه در این بازه قرار می‌گرفتند که وارد مطالعه شدند.

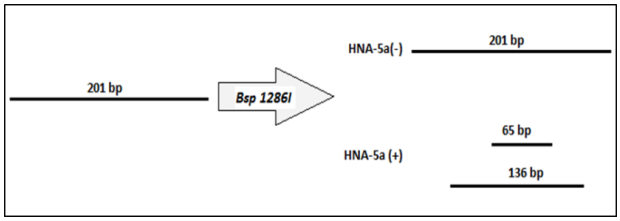
ژنوتیپ HNA-5a با روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms) تعیین شد. با استفاده از توالی آغازگرهای قید شده در منابع مختلف، توالی آغازگرها مشخص و ویژگی‌های آن‌ها توسط نرم‌افزار BLAST تعیین گردید و برای تهیه به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند(۱۰، ۸). حضور یا عدم حضور باند تکثیر شده(محصول واکنش) نشانه حضور یا عدم حضور آلل مربوطه در ژنوم فرد می‌باشد، برای کنترل صحت انجام واکنش تکثیر(PCR) در هر واکنش یک جفت آغازگر که قسمتی از ژن هورمون رشد انسان (HGH) را تکثیر می‌کند به عنوان کنترل داخلی به کار گرفته می‌شوند(جدول ۱). غلظت آغازگرهای HGH به گونه‌ای در نظر گرفته شده است که کمتر از غلظت آغازگرهای HNA-5a باشند، لذا در زمانی که تکثیر آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی به صورت مطلوب انجام شوند، تکثیر ژن HGH هم انجام خواهد شد و رقابت نمی‌کنند. حجم کلی محتوای واکنش، ۲۰ میکرولیتر(شامل ۶ میکرولیتر از نمونه (۲۵ ng) DNA ، ۱۰ میکرولیتر از (ژنت‌بیو) 2 x master mix و ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای HGH-reverse (۰/۲۵ µM)، HGH-forward (۰/۲۵ µM)، HNA-5a-forward (۱ µM) و HNA-5a-reverse (۱ µM) و ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم (۵ unit/µL) Abm-good Hotstart-taq polymerase در هر لوله بود. سپس مخلوط تهیه شده بعد از اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر روغن جامد dinoil در ترموسایکلر قرار داده شد(جدول ۲).

سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به ۷/۵ میکرولیتر H_2O و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم محدود کننده (۱۰ U/µL) Sdu1 (Bsp1286I) و ۲ میکرولیتر بافر 10x buffer Sdul افزوده شد. مخلوط آماده شده را ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس برای غیر فعال شدن آنزیم مذکور، ویال‌ها را در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده؛ با گذاشتن ویال‌ها در ظرف حاوی یخ، عمل هضم متوقف می‌شود. پس از انجام مراحل تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید همراه با Loading dye و با ولتاژ ۱۰۰ ولت ران شده و با دستگاه UV ترانس‌ایلومیناتور مشاهده و قرائت شدند.

باندهای مربوط به هضم یا عدم هضم توسط آنزیم Bsp1286I با یک سایز مارکر مقایسه و مشخص می‌شود. باندهایی که در مقابل سایز مارکرهای ۶۵ bp و ۱۳۶ bp قرار می‌گیرند نشان‌دهنده وجود ژن *HNA-5a* هستند(شکل ۱). درصورتی که قطعه ژنتیکی توسط آنزیم، هضم و شکسته نشود در مقابل باند ۲۰۱ جفت باز قرار می‌گیرد که نشان می‌دهد HNA-5a$^-$ (در نتیجه HNA-5b) است(۳).



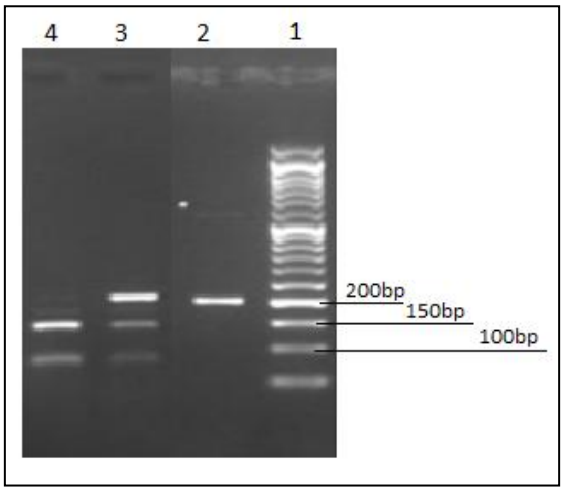
$$5' \ldots G\ D\ C\ H \downarrow C \ldots 3'$$
$$3' \ldots C \uparrow H\ C\ D\ G \ldots 5'$$

شکل ۱: (بالا) سایزهای قطعات تولید شده توسط آنزیم هضم‌کننده Sdu1 (Bsp1286I) . (پایین) توالی DNA شکسته شده توسط آنزیم محدودکننده Sdu 1 bsp1286I

موارد مشاهده شده با آزمون آماری کای‌دو بررسی و مشخص گردید با قانون هاردی واینبرگ تطابق داشت (p= ۰/۵۲). سپس با وارد کردن فراوانی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت مشاهده شده در محاسبه‌گر هاردی واینبرگ، وفور ژنی یا آللی a و b برای HNA-5 به دست آمد. برای مقایسه فراوانی نسبی ژن‌های بین مطالعه حاضر با جمعیت‌های مختلف نیز از آزمون کای‌دو استفاده شد.

یافته‌ها

نمونه خون کامل از ۱۹۰ اهداکننده خون غیر خویشاوند مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون آذربایجان شرقی(مرکز مسجد کبود) شامل ۵۳ زن(۲۷/۹٪) و ۱۳۷ مرد(۷۲/۱٪) در این پژوهش مورد بررسی فنوتیپ قرار گرفتند. فنوتیپ HNA-5a (+/+) در ۹۳ نفر (یا هموزیگوت HNA-5a/5a در ۴۱/۱۲٪) شامل ۲۳ زن و ۷۰ مرد، HNA-5a (-/+) در ۱۰ نفر(یا هتروزیگوت HNA-5a/5b در ۷/۳۳٪) شامل ۳ زن و ۷ مرد، HNA-5a (-/-)در ۸۷ نفر (یا هموزیگوت HNA-5b/5b در ۵۴/۵۵٪) شامل ۲۲ زن و ۶۵ مرد مشاهده گردیدند. فراوانی مشاهده شده مذکور با قانون هاردی واینبرگ تطابق داشت(p> ۰/۹۶). فراوانی آللی یا ژنی HNA-5a برابر با ۰/۵۱ و HNA-5b برابر با ۰/۴۹ به دست آمد(شکل ۲).



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR-RFLP مربوط به ژن *HNA-5* . ستون اول سایز مارکر ۵۰ bp ، ستون دوم نمونه HNA-5a$^-$/5a$^-$ (یا HNA5b/5b هموزیگوت)،ستون سوم نمونه HNA5a$^+$/5a$^-$ (هتروزیگوت HNA5a/5b) ستون چهارم نمونه هموزیگوت HNA5a$^+$/5a$^+$.

بحث

نتایج این مطالعه نشان دادند وفور آللی HNA-5a و HNA-5b به ترتیب برابر با ۰/۵۱ و ۰/۴۹ می‌باشند. ژنوتیپ HNA با استفاده از روش‌های مختلف PCR از اعتبار بیشتری نسبت به روش‌های سرولوژی برخوردار است،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

روش‌های سرولوژی، به منظور تعیین فنوتیپ HNA به علت جداسازی نوتروفیل بسیار وقت‌گیر است که ممکن است با توجه به نیمه عمر پایین نوتروفیل بر روی نتایج تاثیر بگذارد(۸). به دلیل شناسایی اساس مولکولی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی، تعیین ژنوتیپ DNA با استفاده از روش‌های مولکولی به روش PCR نسبت به آزمایش‌های سرولوژیک ارجحیت دارد. ژنوتیپ HNA-1,-3,-4,-5 را می‌توان با PCR-SSP و PCR-RFLP تعیین نمود(۱۱). در سال ۲۰۱۱ هادوک و همکاران شیوع HNA-1,-3,-4,-5 را در ۱۱۹ اهداکننده خون آلمانی و ۱۱۸ اهداکننده ترکیه‌ای به وسیله روش SSP-PCR بررسی کردند(۱۲). فراوانی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی HNA-5a و HNA-5b به ترتیب در آلمان ۰/۷۳۱ و ۰/۲۶۹ و در ترکیه ۰/۷۵۴ و ۰/۲۴۶ بود. تفاوت چشمگیر آماری بین این دو گروه مشاهده نشد و نتایج نشان می‌دهد که انتقال خون و فرآورده‌های آن بین جمعیت این دو کشور باعث تولید آلوآنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی نمی‌شود.

ماتسوهاشی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ فراوانی HNA-1,-3,-4,-5 را به روش مولکولی و سرولوژیک بر روی ۵۰۰ فرد ژاپنی بررسی کردند. ژنوتیپ HNA-5 با روش PCR-SSP بررسی شد. نتایج این مطالعه در پیش‌بینی آلوایمیونیزه شدن به HNA به خصوص در انتقال خون و ناسازگاری مادر و جنین مفید و کارآمد بوده و اولین مطالعه جامع است که همه آنتی‌ژن‌ها را بررسی کرده است(۱۳).

در سال ۲۰۱۳ در تایلند چانگ‌سری و همکاران به بررسی شیوع HNA-1,-3,-4,-5 در ۳۰۰ نفر از اهداکنندگان خون در محدوده سنی ۵۸–۱۸ سال پرداختند. در این روش از خون کامل با ضد انعقاد EDTA استفاده شد. ژنوتیپ HNA-5 با روش PCR-RFLP بررسی شد. نتایج مطالعه‌ها حاکی از وجود فراوانی آللی HNA-5a به میزان ۰/۷۹ بود.(۸)

به طور کلی فراوانی آلل‌های HNA-5a و HNA-5b در جمعیت‌های مختلف به ترتیب در محدوده ۰/۸۶–۰/۷۱ و ۰/۲۸۹–۰/۱۴۵ می‌باشند(جدول ۳).

بررسی آماری نشان داد که وفور آلل‌های HNA-5a و HNA-5b در جمعیت آذری‌ها در مطالعه حاضر با وفور این آلل‌ها در سایر مطالعه‌ها متفاوت است(۸).

در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۳ شاهین و همکاران به بررسی مولکولی وفور آللی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی ۱ الی ۵ در ۱۶۷ اهداکننده خون مراجعه‌کننده به مرکز انتقال خون

جدول ۳: فراوانی ژنی HNA-5a و HNA-5b در مطالعه‌های مختلف

کشور	سال	جمعیت	تعداد	روش	HNA-5a	HNA-5b	منابع
Brazilian India	۲۰۰۶	اهداکننده خون	۱۲۳	PCR RFLP	۰/۷۱۱	۰/۲۸۹	Cardone, (۳) *et al.*
		سرخپوست	۱۱۴		۰/۸۵۵	۰/۱۴۵	
German & Turkish	۲۰۱۱	اهداکننده خون	۱۱۹	SSP-PCR	۰/۷۳۱	۰/۲۶۹	Hauck (۱۲) *et al.*
			۱۱۸		۰/۷۵۴	۰/۲۴۶	
Chinese (GuangzhouHan)	۲۰۱۱	اهداکننده خون	۴۹۳	PCR	۰/۸۵۴	۰/۱۴۶	Xia (۱۴) *et al.*
Japanese	۲۰۱۲	افراد سالم	۵۰۸	SSP-PCR	۰/۸۴۰	۰/۱۶	Matsuhashi (۳) *et al.*
Chinese (Zhejian)	۲۰۱۳	افراد سالم غیر خویشاوند	۴۰۰	PCR	۰/۸۹۶	۰/۱۰۴	He (۱۵) *et al.*
Thailand	۲۰۱۴	اهداکننده خون	۳۰۰	PCR-RFLP	۰/۷۹	–	Changsri (۸) *et al.*
Azari ethnicity	۲۰۱۶	اهداکننده خون	۱۹۱	PCR-RFLP	۰/۵۱	۰/۴۹	مطالعه حاضر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

جدول ۴: مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه شاهین و همکاران(۱۶)

ژنوتیپ	مطالعه شاهین تعداد (درصد)	مطالعه حاضر تعداد (درصد	مجموع	ارزش p
HNA-5 neg/neg (HNA-5b/5b)	(۷/۸) ۱۳	(۴۵/۷۹) ۸۷	(۲۸/۰۱) ۱۰۰	۰/۰۰۰۰۱
HNA-5 pos/neg (HNA-5a/5b)	(۳۸/۳) ۶۴	(۵/۲۶) ۱۰	(۲۰/۷۳) ۷۴	۰/۰۰۰۰۱
HNA-5 pos/pos (HNA-5a/5a)	(۵۳/۹) ۹۰	(۴۸/۹۵) ۹۳	(۵۱/۲۶) ۱۸۳	۰/۳۵
مجموع	۱۶۷	۱۹۰	۳۵۷	

استان تهران از قومیت فارس(به روش مشابه با روش کار مطالعه فعلی) پرداختند(۱۶).

وفور آلل‌های HNA-5a و HNA-5b در مطالعه شاهین به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۲۷ به دست آمد که با مطالعه حاضر مشابه نیست اما بین وفور فنوتیپ $HNA\text{-}5a^{+}/5a^{+}$ بین دو جمعیت آذری در مطالعه حاضر و جمعیت با قومیت فارس در مطالعه شاهین تفاوتی وجود ندارد(جدول ۴). همان گونه که هاوک و همکاران مطرح نمودند در صورت شباهت در وفور ژنی بین جمعیت‌ها، انتقال خون بین دو گروه فوق باعث تولید آلوآنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی نمی‌گردد(۱۲).

نتیجه‌گیری

روش به کار رفته در این مطالعه مبتنی بر PCR-RFLP بوده که بررسی وفور آلل‌های آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی کارآمد می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد که وفور کلی آلل‌های HNA-5a و HNA-5b در قومیت آذری ساکن تبریز به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ می‌باشد. بررسی آماری نشان داد وفور آللی HNA-5 بین دو قومیت فارس و آذری ساکن کشور نیز شبیه نیست، به نظر می‌رسد برای انتقال خون بین دو قومیت باید ملاحظات و بررسی بیشتری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد با حمایت مالی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون/تهران و دانشگاه علوم پزشکی تبریز(دانشکده پزشکی) می‌باشد. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله از دکتر وحید مثمر (مدیر کل مرکز انتقال خون استان آذربایجان شرقی) و خانم سریه محمدی از همکاران محترم مرکز اهدای خون اداره کل پایگاه انتقال خون استان آذربایجان شرقی واقع در شهر تبریز تشکر می‌نمایند.

References :

1- Fung YL, Minchinton R. The fundamentals of neutrophil antigen and antibody investigations. ISBT Science Series 2011; 6(2): 381-6.
2- Stroncek D. ES07.03 Granulocyte antigens and antibody detection. Vox Sang 2004; 87(S1): 91-4.
3- 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.
4- 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.
5- Simsek S, Van der Schoot C, Daams M, Huiskes E, Clay M, McCullough J , *et al*. Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond (a) and Mart (a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera. Blood 1996; 88(4): 1350-8.
6- Muschter S, Berthold T, Greinacher A. Developments in the definition and clinical impact of human neutrophil antigens. Curr Opin Hematol 2011; 18(6): 452-60.
7- Sachs UJ, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G, Santoso S. Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond). Transfus Med 2005; 15(2): 115-7.
8- Changsri K, Tobunluepop P, Songthammawat D, Apornsuwan T, Kaset C, Nathalang O. Human neutrophil alloantigen genotype frequencies in Thai blood donors. Blood Transfus 2014; 12(Suppl 1): s286-91.
9- Akaneme FI, Odo IC, Okafor LA. DNA extraction protocols for Citrullus lanatus and Capsicum

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

frutescens: Effects of incubation temperatures and ethanol concentrations on DNA purity and quantity. African Journal of Biotechnology 2014; 13(5): 634-9.
10- Nathalang O, Intharanut K, Siriphanthong K, Nathalang S, Leetrakool N. Risk estimation of HNA-3 incompatibility and alloimmunization in Thai populations. PloS One 2015; 10(1): e0116905.
11- Nguyen XD, Flesch B, Sachs UJ, Kroll H, Klüter H, Müller-Steinhardt M. IMMUNOHEMATOLOGY: Rapid screening of granulocyte antibodies with a novel assay: flow cytometric granulocyte immunofluorescence test. Transfusion 2009; 49(12): 2700-8.
12- 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.
13- Matsuhashi M, Tsuno N, 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.
14- Xia W, Bayat B, Sachs U, Chen Y, Shao Y, Xu X, *et al*. The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou. Transfusion 2011; 51(6): 1271-7.
15- He J, Zhang W, Wang W, Chen N, Han Z, He J, *et al*. Genotyping of human neutrophil antigens by polymerase chain reaction sequence-based typing. Blood Transfus 2014; 12 Suppl 1: s292-8.
16- Shahin F. Evaluation of HNA-1/-3/-4/-5 in blood donors in Tehran [dissertation]. MSc degree. Tehran: High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine; 2015. p. 52.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 14(2): 84-91

Original Article

The allele frequencies of human Neutrophil Antigens 5 (HNA-5) in Tabriz city

Khosravi A.[1], Shams Asanjan K.[2,3], Shaiegan M.[3], Samiee Sh.[3], Ataee Z.[3], Abdollahi M.[3], Kavari M.[3], Shafiei Almasian M.[3,4], Hosseinzadeh P.[3,4]

[1]*Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[2]*Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[3]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[4]*Tabriz Educational Regional Blood Transfusion Center, Tabriz, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Human neutrophil antigens include 5 antigen systems. These antigens are on the plasma membrane of white blood cells. The aim of the study is to know about HNA allele frequency in the population in order to estimate the prevalence of the diseases related to HNA-5.

Materials and Methods

In this descriptive study, blood samples were taken from 190 Azari unrelated blood donors having referred to Tabriz Blood Center. DNA extraction was performed using commercial kit Pars Tous. HNA-5a and HNA-5b molecular were then evaluated by PCR-RFLP. PCR products were digested using enzymes Sdu1 Bsp1286I. HNA-$5a^+$ and HNA-$5a^-$ (or HNA-5b) antigen gene frequencies were calculated using the Hardy-Weinberg equation.

Results

HNA-5a (+/+), HNA-5a (+/-) and HNA-5a (-/-) phenotypes were observed in 93, 10 and 87 patients, respectively. The observed frequencies were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium; allele frequencies of HNA-$5a^+$ and HNA-$5a^-$ (or HNA-5b) were equal to 0.51 and 0.49, respectively.

Conclusions

HNA-5 alleles frequency rates were in the same range reported for the other populations.

Key words: Neutrophils, PCR, Blood Donors

Received: 4 Feb 2017
Accepted: 24 Apr 2017

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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-29]