خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۱ (۲۲۳-۲۱۶)
مقاله پژوهشی

# فراوانی آنتی‌ژن نوتروفیلی(HNA-1) در بیماران تالاسمیک دارای تزریق خون مکرر و مبتلا به عارضه تب‌زای غیرهمولیتیک

*بنیامین رحمتی[۱]، مریم زادسر[۲]، شهرام سمیعی[۳]، مژگان شایگان[۴]*

## چکیده

### سابقه و هدف

آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی یا HNAها، آنتی‌ژن‌های گلیکوپروتئینی سطح نوتروفیل‌ها هستند، آنتی‌بادی بر علیه این آنتی‌ژن‌ها در بیماران دارای تزریق خون مکرر تولید می‌گردد. در این پژوهش به بررسی فراوانی آللیک HNA-1a/1b/1c در بیماران دارای تزریق خون مکرر مبتلا به عارضه تب‌زای انتقال خون و هم‌چنین خطر آلوایمیونیزاسیون این افراد بر اساس الگوی ژنوتیپ پرداختیم.

### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، ۹۹ نفر از بیماران تالاسمی وارد مطالعه شدند. نمونه‌گیری از تیر ۹۸ تا اسفند ۹۸ در مرکز تالاسمی ظفر به طول انجامید. افراد از خون‌های کم لکوسیت استفاده می‌کردند. ۳ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شدند، DNA استخراج شد. ژن *HNA-1* به روش PCR-SSP بررسی شد. فراوانی آللی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی با استفاده از معادله هاردی واینبرگ محاسبه گردید و برای تحلیل داده‌ها از آزمون‌های کای ـ دو و T test استفاده شد.

### یافته‌ها

فراوانی آلل‌های مشاهده شده به ترتیب(۵۲/۷٪)HNA-1a ، (۴۴/۳٪)HNA-1b و (۳٪)HNA-1c بودکه با قانون هاردی واینبرگ با ضریب اطمینان ۵٪ تطابق داشت. بیشترین میزان خطر آلوایمیونیزاسیون به ترتیب مربوط به (۲۲٪)HNA-1b ، (۱۸٪)HNA-1a و (۳٪)HNA-1c بود.

### نتیجه گیری

فراوانی آللیک آنتی‌ژن نوتروفیلی HNA-1 در بیماران تالاسمیک مبتلا به عارضه تب‌زای غیرهمولیتیک انتقال خون با یافته‌های قبلی در جمعیت‌های مختلف ایرانی مطابقت داشت. هم‌چنین علی‌رغم شباهت آنتی‌ژنی در بیشتر آلل‌ها و دریافت خون کم لکوسیت در بیماران، هم‌چنان خطر آلوایمیونیزاسیون وجود داشته و توجه به تزریق خون بر اساس الگوی ژنوتیپ نوتروفیلی را بیشتر مورد توجه قرار می‌دهد.

***کلمات کلیدی:*** عارضه تب‌زای غیرهمولیتیک، نوتروفیل‌ها، انتقال خون، تالاسمی

*تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۹*
*تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹*

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- دکترای ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]

[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

## مقدمه

HNA ، آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی انسانی هستند که در پنج سیستم آنتی‌ژنیک تقسیم‌بندی می‌شوند و بر روی سلول‌های نوتروفیلی قرار دارند. آنتی‌ژن‌ها از جایگزینی یک جفت باز در توالی ژنی آن‌ها به وجود آمده‌اند و این جایگزینی باعث تغییر نوع اسید آمینه و در نتیجه ایجاد الگوی آنتی‌ژنیک متفاوت در افراد، قومیت‌ها، جمعیت‌ها و بیماری‌های مختلف می‌شود(۲، ۱). این اختلاف سبب تولید آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن‌ها می‌گردد. این آنتی‌بادی‌ها در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های مختلفی هم‌چون نوتروپنی اتوایمیون(Autoimmune Neutropenia) و نوتروپنی آلوایمیون نوزادان( Neonatal Alloimmune Neutropenia)، آسیب حاد ریوی ناشی از تزریق خون، مقاومت به تزریق گرانولوسیت‌ها و واکنش تب‌زای غیرهمولیتیک، دخالت دارند. یکی از این سیستم‌های آنتی‌ژنی، سیستم HNA-1 با ۴ آلل می‌باشد که بر روی گلیکوپروتئین FcγRIIIb نوتروفیل‌ها و با تعداد متوسط ۱۹۰۰۰۰ (۴۰۰۰۰۰-۱۲۰۰۰۰) قرار گرفته است(۴، ۳).

پلی‌مورفیسم‌های ایجاد شده HNA-1 که در ۴ آلل تقسیم‌بندی می‌شوند، در اثر جابه‌جایی ۵ نوکلئوتید در اگزون شماره ۳ ژن *FCGR۳B* ایجاد می‌شود. سیستم HNA-1 از ۴ آلل FCGR۳ B.۱ تا FCGR۵ B.۱ تشکیل شده که تفاوت هر یک از آلل‌ها در ۵ نوکلئوتید است به طوری که آلل FCGR۳B.۳ اپی‌توپ‌های HNA-1b و HNA-1c را تشکیل می‌دهند و آلل FCGR۳B.۱ با ۳B.۲ FCGR آلل‌های HNA-1a و در ترکیب این دو آلل با آلل FCGR۳B.۳ اپی‌توپ HNA-1b را نیز به وجود می‌آورد(۶، ۵). تغییرات در تعداد کپی ژن FCGR۳B که در اثر کراسینگ‌اور نابرابر یا افزایش در کپی از ژن در اثر ترکیب با پدیده نوترکیبی اتفاق می‌افتد، باعث می‌شود این افراد هر ۳ آلل آنتی‌ژنیک HNA-1a/1b/1c را روی یک کروموزوم بیان کنند که به این پدیده ژن داپلیکیشن می‌نامند(۷). بیان آلل HNA-1a از ۵۸٪ در افراد با نژاد آسیایی اروپایی تا ۹۱٪ در مردمان تایوان متفاوت است(۵). بیان آلل HNA-1b در آمریکایی‌های آفریقایی تبار، ۳۱٪ و در هندی‌های آسیایی تبار ۷۰٪ بود. هم چنین شیوع این آلل در سفیدپوستان و اسپانیایی تبارها به ترتیب ۳۷٪ و ۵۳٪ بوده و در بین بومیان آمریکا ۵۵٪ گزارش شده است(۸). شیوع HNA-1c در آفریقایی‌ها ۳۸ ٪ و در آمریکایی‌ها ۲۳٪ و در بین اروپایی‌ها ۵٪ گزارش شده است(۹). میزان بروز عارضه تب‌زای غیرهمولیتیک(Febrile non- = FNHTR hemolytic reaction) در کیسه‌های بدون فیلتر لوکوسیتی بین ۳۳ تا ۳۶ درصد و در کیسه‌های با فیلتراسیون لوکوسیتی بین ۱۸ تا ۱۹ درصد می‌باشد که خود نشان‌دهنده این است که عوامل دیگری نیز در بروز این پدیده دخیل می‌باشد(۱۰). عارضه FNHTR در کسانی که سابقه تزریق خون مکرر دارند و مولتی ترانسفیوز هستند بالا می‌باشد(۱۱). مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها(CDC) و انجمن بین‌المللی انتقال خون(ISBT) تعریفی که از FNHTR دارند عبارت است از افزایش یک درجه از دمای بدن و یا تب بیشتر یا مساوی ۳۸°C به همراه لرز یا لرز شدید، متأسفانه این علائم اختصاصی FNHTR نبوده و باید از سایر عوارض انتقال خون هم‌چون واکنش حاد همولیتیک(AHR) و واکنش تأخیری همولیتیک(DHR)، آلودگی باکتریایی، TRALI ، گرانباری حجم(TACO) و سایر بیماری‌های زمینه‌ای افتراق داده شود(۱۲).

با توجه به عدم وجود گزارش منتشر شده از وفور ژنی و آللی سیستم HNA-1 در افراد مولتی ترانسفیوز مبتلا به عارضه FNHTR ، در این مطالعه فرآوانی آلل‌های این سیستم به روش PCR-SSP در بین ۹۹ نفر از بیماران تالاسمیک که در مرکز تالاسمی«ظفر» خون دریافت می‌کردند، مورد مطالعه قرار گرفت و الگوی ژنوتیپ این بیماران با اهداکنندگان سالم جامعه مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی- مقطعی بوده از ۹۹ بیمار تالاسمیک که با تأیید پزشک، مبتلا به عارضه FNHTR بودند، مقدار ۳ میلی‌لیتر خون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد، قبل از نمونه‌گیری از بیماران خواسته شد تا فرم رضایت‌مندی را پر کنند، نمونه‌گیری از تیر ۹۸ تا اسفند ۹۸ در مرکز تالاسمی ظفر به طول انجامید. اطلاعات مورد نیاز از قبیل سن، جنس، دفعات تزریق خون



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]
[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

در ماه بیماران ثبت گردید، 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(PBS) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به ویال، مجدداً ۱۰ ثانیه میکروفیوژ شد. بعد از چرخش سریع، محتوای لیزات در یک ستون فیلتردار ریخته شده و ۱ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از دو بار شستشو با محلول‌های شستشوی شماره ۱ و ۲ پارس طوس، نمونه‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول الوشن پارس طوس انکوبه شد.

نهایتاً DNA با ۵ دقیقه سانتریفیوژ از فیلتر خارج و جمع‌آوری گردید. با توجه به این که نسبت ۲۶۰/۲۸۰ به عنوان درجه خلوص DNA و کنترل کیفیت DNA استخراج شده با محدوده ۱/۹–۱/۷ نانومتر مطرح است، بنابراین کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ(biowaver II WPA) با جذب نوری در طول موج‌های ۲۳۰ نانومتر، ۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر و نسبت‌های جذبی ۲۶۰/۲۳۰،۲۶۰/۲۸۰ قرائت شد (۱۳). ژنوتیپ HNA-1a/1b/1c با روش PCR-SSP تعیین شد. با استفاده از توالی‌های آغازگر 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(۱۴). حضور یا عدم حضور باند تکثیر شده(محلول واکنش) نشانه حضور یا عدم حضور آلل مربوطه در ژنوم 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 می‌شود.(۱۵).

غلظت آغازگرهای HGH به گونه‌ای در نظر گرفته شده است که کمتر از غلظت آغازگرهای HNA-1a/1b/1c باشند، لذا زمانی که تکثیر آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی به صورت مطلوب انجام شدند، تکثیر HGH هم انجام خواهد شد (۱۶). مراحل آماده‌سازی مواد جهت انجام واکنش PCR به ترتیب شامل:

۱- حجم کلی محتوای واکنش ۲۰ میکرولیتر(شامل ۶ میکرولیتر DNA ، آغازگرهای HNA با غلظت µL ۲۰ و به حجم ۱ میکرولیتر، آغازگرهای کنترل داخلی هورمون رشد با حجم ۱ میکرولیتر و غلظت µL ٪۲۵ ، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Hot Start-Taq Polymerase و ۹/۷ میکرولیتر master mix) در هر لوله بود.

۲- بعد از اضافه کردن ۲۵ میکرولیتر روغن جامد dinoil در ترمال سایکلر قرار داده شد.

۳- استفاده از برنامه Touchdown برای بهینه کردن برنامه دستگاه ترمال‌سایکلر این روش به منظور تعیین بهترین دما برای اتصال اختصاصی آغازگرها به توالی هدف قبل از هرگونه اتصال غیر اختصاصی انجام می‌شود.

۴- پس از انجام مراحل تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ همراه با Loading Dye و با ولتاژ ۱۵۰–۱۰۰ ولت ران شده و با دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مشاهده و قرائت شدند و باندهای ایجاد شده با یک سایزمارکر مقایسه و مشخص گردید. سپس با وارد کردن فراوانی موارد هموزیگوت و هتروزیگوت در محاسبه‌گر هاردی واینبرگ، وفور ژنی یا آللی a,b,c برای HNA-1 به دست آمد(۱۷). احتمال ناسازگاری بین آنتی‌ژن‌های مختلف سیستم HNA را بعد از هر بار تزریق خون راندوم بر اساس شیوع آلل‌های سیستم HNA و هم‌چنین احتمال ریسک آلوایمیونیزاسیون برای هر آلل را بر اساس شیوع ژنوتیپ هر سیستم آنتی‌ژنیک محاسبه نمود(۱۸).

در این پژوهش نیز علاوه بر سایر پارامترهای مورد مطالعه همچون سن، جنس، دفعات تزریق خون، به بررسی خطر آلوایمیونیزاسیون آنتی‌ژن HNA-1 نوتروفیلی بیماران تالاسمیک پرداخته شد. محاسبه احتمال ناسازگاری بین آنتی‌ژن سیستم HNA ، بعد از هر بار تزریق راندوم از طریق فرمول ۱ انجام شد:

$$a^2(1-a^2)+b^2(1-b^2)=2ab(1-ab)$$

محاسبه احتمال خطر آلوایمیونیزاسیون برای هر آلل نیز از طریق فرمول ۲ که برای آلل a,b محاسبه شده است انجام می گیرد:



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]

[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

**جدول ۱: توالی آغازگرها، اندازه مورد انتظار برای محصولات تکثیری آنتی‌ژن HNA-1**

| System | آنتی‌ژن | سایز | توالی 5' → 3' | اندازه محصول(bp) |
|---|---|---|---|---|
| HNA-1 | HNA-1a (F) | ۲۰ | 5' CAGTGGTTTCACAATGTGAA 3' | ۱۴۱ |
| | HNA-1a (R) | ۱۸ | 3' ATGGACTTCTAGCTGCAC 5' | |
| | HNA-1b (F) | ۱۸ | 5' CAATGGTACAGCGTGCTT 3' | ۲۱۹ |
| | HNA-1b (R) | ۱۸ | 3' ATGGACTTCTAGCTGCAC 5' | |
| | HNA-1c (F) | ۲۰ | 5' AAGATCTCCCAAAGGCTGTG 3' | ۱۹۱ |
| | HNA-1c (R) | ۱۹ | 3' ACTGTCGTTGACTGTGTCAT 5' | |
| (HGH)human Growth hormon | HGH (F) | ۲۲ | 5'TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA3' | ۴۳۴ |
| | HGH ® | ۲۶ | 3'CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC5' | |

Risk for a phenotypes = bb(ab+aa)
Risk for b phenotypes = aa(ab+bb)

فراوانی آللی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی با استفاده از معادله هاردی- وینبرگ محاسبه گردید. این قانون امکان تعیین شیوع ژنوتیپی یک ژن در جمعیت خاص را با استفاده از فراوانی‌های آللی آن فراهم می‌آورد. بر اساس قانون هاردی- وینبرگ معادله زیر برقرار خواهد بود:

$1pq= q^2 \pm 2p$

طبق این فرمول : q فراوانی یک آلل و p فراوانی آلل دیگر است. ارزش p کمتر از ۰/۰۵ بیانگر عدم تطابق با قانون فوق است. در ابتدا از شاخص‌های آمار توصیفی (فراوانی و درصد فراوانی) جهت بررسی ویژگی‌های جمعیت شناختی بیماران مبتلا به تالاسمی استفاده شد. در ادامه برای تفسیر داده‌ها و پاسخگویی به سوالات پژوهشی از آزمون استنباطی کای‌دو، برای تعیین تفاوت آنتی‌ژن و مقایسه وفور آلل‌ها در این مطالعه با وفور آلل‌های HNAs در سایر مطالعه‌ها، از آزمون مقایسه نسبت‌ها کای- دو طبق فرمول زیر استفاده شد.

$$x^2 = \sum \frac{(f_0 - f_e)^2}{f_e}$$

f0 : فراوانی مشاهده شده

fe : فراوانی مورد انتظار

**یافته‌ها**

نمونه خون کامل از ۹۹ بیمار مولتی‌ترانسفیوز مبتلا به عارضه FNHTR در مرکز تالاسمی ظفر شامل ۶۲ زن (۶۲٪) و ۳۷ مرد(۳۷/۳۷٪) گرفته شد. از ۹۹ بیمار تالاسمیک، ۶۲/۶۲ درصد بیماران زن(۶۲ نفر) و ۳۷/۳۷ درصد بیماران مرد بودند(۳۷ نفر). میانگین سنی زنان ۹ ± ۳۷ سال و میانگین سنی مردان ۱۰/۱۳ ± ۳۴ سال بود، میانگین سنی تمام افراد شرکت کننده ۹/۵۶ ± ۳۵ سال بود. کمترین سن فرد شرکت‌کننده در این پژوهش ۱۴ سال و بیشترین سن فرد شرکت‌کننده نیز ۷۲ سال بود. میانگین سنی تمام افراد شرکت‌کننده ۳۵ سال ۹/۵۶ ± ۳۵ بود. تمامی افراد مورد مطالعه از واحدهای خون تزریقی فیلتردار لوکوسیتی pre-storage Leucoreducted استفاده می‌کردند. میانگین فاصله تزریق خون در زنان ۱۵/۳۸ ± ۲۴/۳۰ روز و میانگین فاصله تزریق گروه مردان ۱۲/۶۷ ± ۲۴/۵۹ روز به دست آمد ولی اختلاف معنادار نبود. فراوانی و الگوی ژنوتیپ به دست آمده برای آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی با استفاده از معادله هاردی - واینبرگ با ضریب اطمینان ۵٪ به شرح زیر به دست آمد: HNA-1a(۵۲/۷٪) ، (۴۴٪/۳) HNA-1b و (۳٪) HNA-1c ولی اختلاف معنادار نبود. ۲۴٪ افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت $HNA\text{-}1b^+/1b^+$ و ۳۴٪ افراد نیز به صورت هموزیگوت $HNA\text{-}1a^+/1a^+$ بودند. ۴۱٪ افراد به صورت هتروزیگوت $HNA\text{-}1a^+/1b^+$ بود. هم‌چنین ۳ نفر دارای آنتی‌ژن $HNA\text{-}1c^+$ بودند که دو مورد از آن‌ها دارای ژنوتیپ $1a^+/1b^-/1c^+$ و یک مورد دارای $1a^+/1b^+/1c^+$ بود.

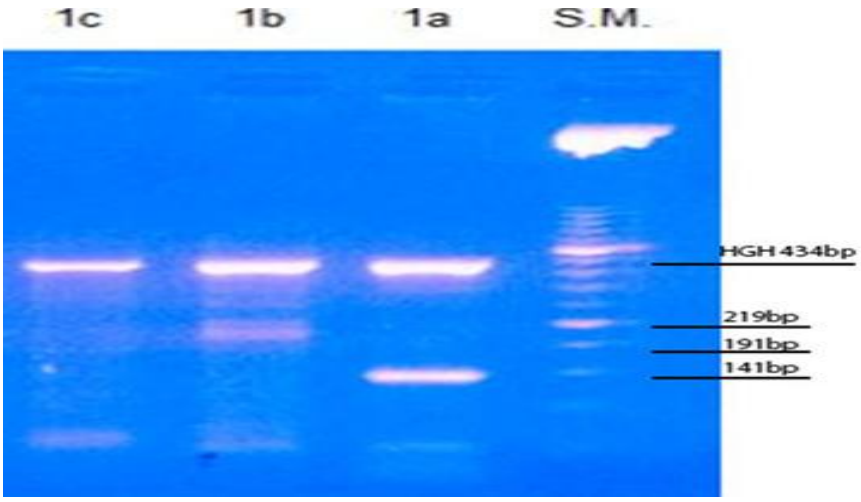


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]

[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

**جدول ۲: نتایج شیوع آلل‌های مورد بررسی ژنوتیپ HNA-1**

| ژنوتیپ | تعداد مورد مشاهده شده | درصد | تعداد مورد انتظار | درصد | هاردی ـ واینبرگ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | p value | χ2 |
| HNA1aa | ۳۳ | ۳۳/۳۳ | ۳۶ | ۳۶ | ۰/۲۳ | ۰/۴۰ |
| HNA1bb | ۲۳ | ۲۳/۲۳ | ۲۷ | ۲۷ | | |
| HNA1ab | ۴۰ | ۴۰/۴ | ۳۰/۸ | ۳۰/۸ | | |
| HNA1ac | ۲ | ۲/۰۲ | ۷/۴ | ۷/۴ | | |
| HNA1bc | ۱ | ۱/۰۱ | ۶/۹ | ۶/۹ | | |




**شکل۱ : نتایج الکتروفورز محصول PCR-SSP مربوط به ژن *HNA-1* . از راست به چپ ستون اول سایز مارکر bp ۵۰، ستون دوم نمونه مربوط به آلل (HNA-1a+(141bp ، ستون سوم نمونه آلل (NA-1b+(219bp ستون چهارم (HNA-1c-(191bp ، باند (HGH(434bp در تمامی ستون‌ها به وضوح رؤیت شد.**

احتمال ناسازگاری بین سیستم HNA بعد از هر بار تزریق راندوم برای آنتی‌ژنHNA-1 ٪۳۶ بود و احتمال خطر آلوایمیونیزاسیون علیه هر یک از آلل‌های سیستم HNA به ترتیب برای (٪۱۸) HNA-1a ، (٪۲۲) HNA-1b ، (٪۳) HNA-1c بود هم‌چنین احتمال ناسازگاری بین آنتی‌ژن سیستم HNA-1 بعد از هر بار تزریق راندوم ٪۳۶ بود.

## بحث

نتایج این مطالعه نشان داد وفور آللی(٪۵۲/۷)HNA-1a ، (٪۴۴/۳)HNA-1b و (٪۳)HNA-1c می‌باشند. در این مطالعه اختلاف معناداری بین میانگین سن مردان و زنان دیده نشد. میانگین فاصله تزریق خون در زنان ۱۵/۳۸ ± ۲۴/۳۰ و میانگین فاصله تزریق گروه مردان ۱۲/۶۷ ± ۲۴/۵۹ روز به دست آمد ولی اختلاف معنادار نبود. هم‌چنین اختلاف معناداری از لحاظ ژنوتیپ با سن، جنس و دفعات تزریق خون دیده نشد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تزریق خون بدون توجه به ژنوتیپ HNA گیرنده خون، احتمال خطر آلوایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های سیستم HNA را افزایش می‌دهد به طوری که تولید آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن‌ها به عنوان یکی از دلایل بروز عارضه FNHTR شرح داده شده است(۱۹). نتایج حاصل از مطالعه ما بر روی الگوی ژنوتیپ بیماران دارای تزریق خون مکرر و دارای عارضه FNHTR با مطالعه‌های



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]
[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

انجام شده در سازمان انتقال خون ایران که بر روی ژنوتیپ اهداکنندگان سالم انجام شده بود مقایسه گردید؛ مقایسه فراوانی به دست آمده از هر یک از آلل‌های مورد مطالعه این پژوهش با مطالعه‌های انجام شده در ایران نشان داد که فراوانی آلل 1a در مطالعه‌های انجام شده ما و یافته‌های حاصل از مطالعه خانم شاهین و خسروی درسازمان انتقال خون ایران در محدوده ۵۴-۳۷ درصد بوده و با یافته‌های حاصل از کشورهایی هم‌چون ترکیه(۴۲٪)، آلمان(۳۹٪)، آمریکا(۳۷٪) و تایلند بخش مرکزی(۵۴٪) مطابقت داشت. هم‌چنین با مطالعه‌های انجام شده در کشورهایی هم‌چون چین(۶۶٪)، کره(۷۲٪)، تایوان(۶۸٪) و ژاپن(۶۲٪) متفاوت بود(۱۹). فراوانی آلل 1b حاصل از مطالعه ما و مطالعه خانم شاهین، خسروی و همکاران در محدوده ۶۳-۴۴ درصد بوده که با مطالعه‌های انجام شده در کشورهایی هم‌چون ترکیه(۵۴٪)، آلمان(۶۰٪)، دانمارک(۶۳٪) و آمریکا (۶۳٪) مطابق بوده و با کشورهایی هم‌چون شمال تایلند (۳۰٪)، کره(۲۷٪)، چین(۳۳٪) و تایوان (۳۲٪) متفاوت بود. فراوانی آلل 1c در مطالعه ما و مطالعه خانم شاهین، خسروی و همکاران در محدوده ۰/۳-۰/۱ درصد بوده که با مطالعه‌های انجام شده در کشورهایی هم‌چون ترکیه با فراوانی(۰/۳٪)، آلمان(۰/۳٪)، فرانسه(۰/۳٪)، آرژانتین (۲۳٪) و برمه(۰/۳٪) مطابق بوده و با کشورهایی هم‌چون زامبیا(۲۵٪) و اوگاندا(۱۷٪) متفاوت بوده است.

با توجه به خطر آلوایمیونیزاسیون محاسبه شده برای هر آلل و هم‌چنین مطالعه‌های انجام شده در ایران بر روی وفور آللی آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی در دو مطالعه شاهین، خسروی و همکاران و هم‌چنین مطالعه ما، خطر آلوایمیونیزاسیون برای هر یک از آلل‌های 1a و 1b محاسبه گردید به طوری که این خطر برای آلل HNA-1a در مطالعه‌های انجام شده شاهین، خسروی و همکاران به ترتیب ۲۳٪ و ۲۷٪ و در مطالعه ما ۱۸٪ محاسبه گردید(۲۱، ۲۰). این یافته‌ها با مطالعه‌های کشورهایی هم‌چون ترکیه (۲۰٪)، دانمارک(۲۱٪)، انگلیسی‌های آسیایی‌تبار(۲۳٪)، فرانسه(۲۴٪)، آلمان(۲۴٪) و اسپانیا(۲۴٪) مطابقت داشته و با کشورهایی هم‌چون تایوان(۸ ٪)، ژاپن(۱٪)، چین(۸٪) و برمه(۱۳٪) تفاوت معناداری داشته و نشان می‌دهد که شیوع آلل HNA-1a در این کشورها(ژاپن، چین، برمه ، تایوان) به طور معناداری بالاتر از سایر نقاط دنیا می‌باشد، هم‌چنین خطر آلوایمیونیزاسیون برای آلل HNA-1b در مطالعه‌های انجام شده خسروی، شاهین و همکاران و مطالعه ما به ترتیب(۱٪)، (۲۵٪)، (۲۲٪ ) بود که میزان خطر آلوایمیونیزاسیون حاصل از مطالعه‌های خانم خسروی با کشورهایی هم‌چون هند (۱۳٪)، ترکیه(۱۳٪)، دانمارک (۱۲٪)، فرانسه(۱٪)، آلمان (۱۲٪) مطابق بوده و تفاوت معناداری با مطالعه‌های حاصل از کشورهایی هم‌چون چین(۲۴٪)، تایوان(۲۴٪)، ژاپن(۲۳٪) داشت. داده‌های حاصل از مطالعه خانم شاهین و مطالعه ما از آلل HNA-1b با این کشورها مطابقت داشته و با کشورهایی هم‌چون هند، ترکیه، فرانسه و آلمان تفاوت معناداری دارد. خطر آلوایمیونیزاسیون برای HNA-1c در هر ۳ مطالعه انجام شده در سازمان انتقال خون بین ۱٪ تا ۳٪ متفاوت بوده که با کشورهای اروپایی مطابقت داشته و با کشورهای آفریقایی با شیوع(۳۸٪) و آمریکایی‌ها(۲۳٪) متفاوت بود (جدول ۲).

همان طور که هاوک و همکاران مطرح نمودند، در صورت شباهت در وفور ژنی بین جمعیت‌ها، انتقال خون بین دو گروه باعث تولید آلوآنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی نمی‌گردد(۲۲). هم‌چنین مطالعه ما بر روی خطر آلوایمیونیزاسیون آلل‌ها نشان می‌دهد که علی‌رغم شباهت آنتی‌ژنی در بیشتر آلل‌ها، در مطالعه‌های مختلف در کشور هم‌چنان خطر آلوایمیونیزاسیون وجود داشته و تفاوت در برخی آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف نیز دیده شد.

## نتیجه‌گیری

بررسی‌ها نشان داد وفور آللی(۵۲/۷٪)HNA-1a ، (۴۴/۳٪)HNA-1b و (۳٪)HNA-1c و احتمال خطر آلوایمیونیزاسیون این آلل‌ها به ترتیب ۱۸٪ ، ۲۲٪ و ۳٪ بوده و فراوانی آلل‌های آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی بیماران FNHTR در این مطالعه با یافته‌های قبلی بر روی اهداکنندگان ایران مطابقت داشته است. به نظر می‌رسد با توجه به باقی بودن خطر احتمالی آلوایمیونیزاسیون علی‌رغم شباهت‌های آللی و هم‌چنین با توجه به این که هنوز بسیاری از افراد در ایران فرآورده‌های کاهش



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]
[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

لکوسیت یافته استفاده نمی‌کنند، احتمال آلوایمیونیزاسیون اهداکنندگان با سابقه تزریق خون بر علیه آنتی‌ژن‌های نوتروفیلی قابل توجه بوده و پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی مورد مطالعه قرار گیرد.

**تشکر و قدردانی**

این مطالعه قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد که بودجه آن از سازمان انتقال خون ایران تأمین شده است. از استاد ارجمند خانم دکتر آزیتا آذرکیوان برای انتخاب بیماران FNHTR و هم‌چنین از همکاران بخش پرستاری مرکز تالاسمی ظفر که همکاری صمیمانه در این تحقیق داشتند، سپاسگزاریم.

## References:

1- Flesch BK, Reil A. Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. Transfus Med Hemator 2018; 45: 300-9.
2- Browne T, Dearman RJ, Poles A. Human neutrophil antigens: Nature, clinical significance and detection. Int J Immunogenet 2021; 48(2): 145-56.
3- Flesch BK , Curtis BR , de Haas M , Lucas G , Sachs UJ. Update on the nomenclaturc of human neutrophil antigens and alleles. Tranfusion 2016; 56: 1477-9.
4- Flesch BK, Reil A. Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. Transfus Med Hemother 2018; 45(5): 300-9.
5- Flesch BK, Reil A. Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. Transfus Med Hemother 2018; 45(5): 300-9.
6- Browne T, Dearman RJ, Poles A. Human neutrophil antigens: Nature, clinical significance and detection. Int J Immunogenet 2021; 48(2): 145-56.
7- Tam K, Tang I, Ho J, Yeung W, Lee CK, Ip P, *et al*. A study of human neutrophil antigen genotype frequencies in Hong Kong. Transfus Med 2018; 28(4): 310-8.
8- Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ, Aster RH. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. Transfusion 1996; 36(10): 895-9.
9- Kissel K, Hofmann C, Gittinger F, 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.
10- Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. Nat Immunol 2014; 15(7): 602-11.
11- Fung MK, Heddle NM. Febrile and Allergic Transfusion Reactions. In: Murphy MF, Roberts DJ, Phil D, Yazer MH. Practical Transfusion Medicine ; 2017. p. 9.
12- Tobian AA, Savage WJ, Tisch DJ, Thoman S, King KE, Ness PM. Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. Transfusion 2011; 51: 1676-83.
13- Esmaeili B, Bayat B, Alirezaee A, Delkhah M, Mehdizadeh MR, Pourpak Z. Human Neutrophil Antigen Genotype and Allele Frequencies in Iranian Blood Donors. J Immunol Res 2022; 2022: 4387555.
14- 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.
15- Veldhuisen B, Porcelijn L, Ellen van der Schoot C, de Haas M. Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). Transfus Apher Sci 2014; 50(2): 189-99.
16- Sanz C, Freire C, Alcorta I, Ordinas A, Pereira A. Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. Transfusion 2001; 41(6): 762-5.
17- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp 2012; (62): 3923.
18- Simtong P, Puapairoj C, Leelayuwat C, Santoso S, Romphruk AV. Assessment of HNA alloimmunisation risk in Northeastern Thais, Burmese and Karen. Transfus Med 2018; 28(1): 47-55.
19- Xia W, Ye X, Xu X, Chen D, Deng J, Chen Y, *et al*. The prevalence of leucocyte alloantibodies in blood donors from South China. Transfus Med 2015; 25(6): 385-92.
20- Bayat B. Molecular examination of neutrophil antigens (5-4-3-2-1) HNA in blood donors by molecular method (PCR). [Thesis for MS Degree]. Tehran: High Institute for Research & Education in Transfusion Medicine; 2015.
21- Shams Asanja K, Shaiegan M, Samiei S. The allele frequencies of human neutrophil antigens 5 (HNA-5) in Tabriz city. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(2): 84-91. [Article in Farsi]
22- 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.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]
[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (3): 216-223*

***Original Article***

# Evaluation of allelic frequency of neutrophil antigen (HNA-1) in thalassemia patients with recurrent blood transfusion and FNHTR complication

***Rahmati B.[1], Zadsar M.[1], Samiee Sh.[1], Shaigan M.[1]***

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

## Abstract

***Background and Objectives***

HNAs are glycoprotein antigens on the surface of neutrophils. Antibodies against these antigens are produced in patients with repeated blood transfusions. We here study the HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c gene frequencies in regulary transfused patients suffering from hemolytic transfusion reactions as well as the risk of alloimmunization of these individuals based on the genotype pattern.

***Materials and Methods***

As the study population, 99 thalassemia patients were included in the descriptive study. Sampling lasted from July 2019 to March 2020 at Zafar Thalassemia Center. Patients were administered low-leukocyte blood. Three mL of blood was collected in tubes containing EDTA and DNA was extracted. HNA-1 gene was analyzed by PCR-SSP method. Allelic frequency of neutrophil antigens was calculated using Hardy-Weinberg equation. Chi-square and T-test were used to analyze the data.

***Results***

The frequency rates of observed alleles were 52.7% for HNA-1a, 44.3% for HNA-1b, 3% for HNA-1c, which was in accordance with Hardy-Weinberg's law with a 5% confidence interval. The highest risk of alloimmunization to HNA-1b, HNA-1a, and HNA-1c were 22%, 18%, and 3%, respectively.

***Conclusions***

The frequency of HNA-1 neutrophil antigen allele in thalassemia patients with febrile blood transfusion was consistent with previous findings in different Iranian populations. Patients still have a risk of alloimmunization and blood transfusion based on neutrophilic genotype pattern.

***Key words:*** FNHTR, Neutrophils, Blood Transfusion, Thalassemia

*Received: 28 Feb 2022*
*Accepted: 30 May 2022*

*Correspondence:* Zadsar M., MD. Specialist in Infectious Diseases. 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) 82052234; Fax: (+9821) 88628741
E-mail: *maryam.zad@gmail.com*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15 ]

[ DOR: 20.1001.1.10279520.1401.19.3.2.2 ]