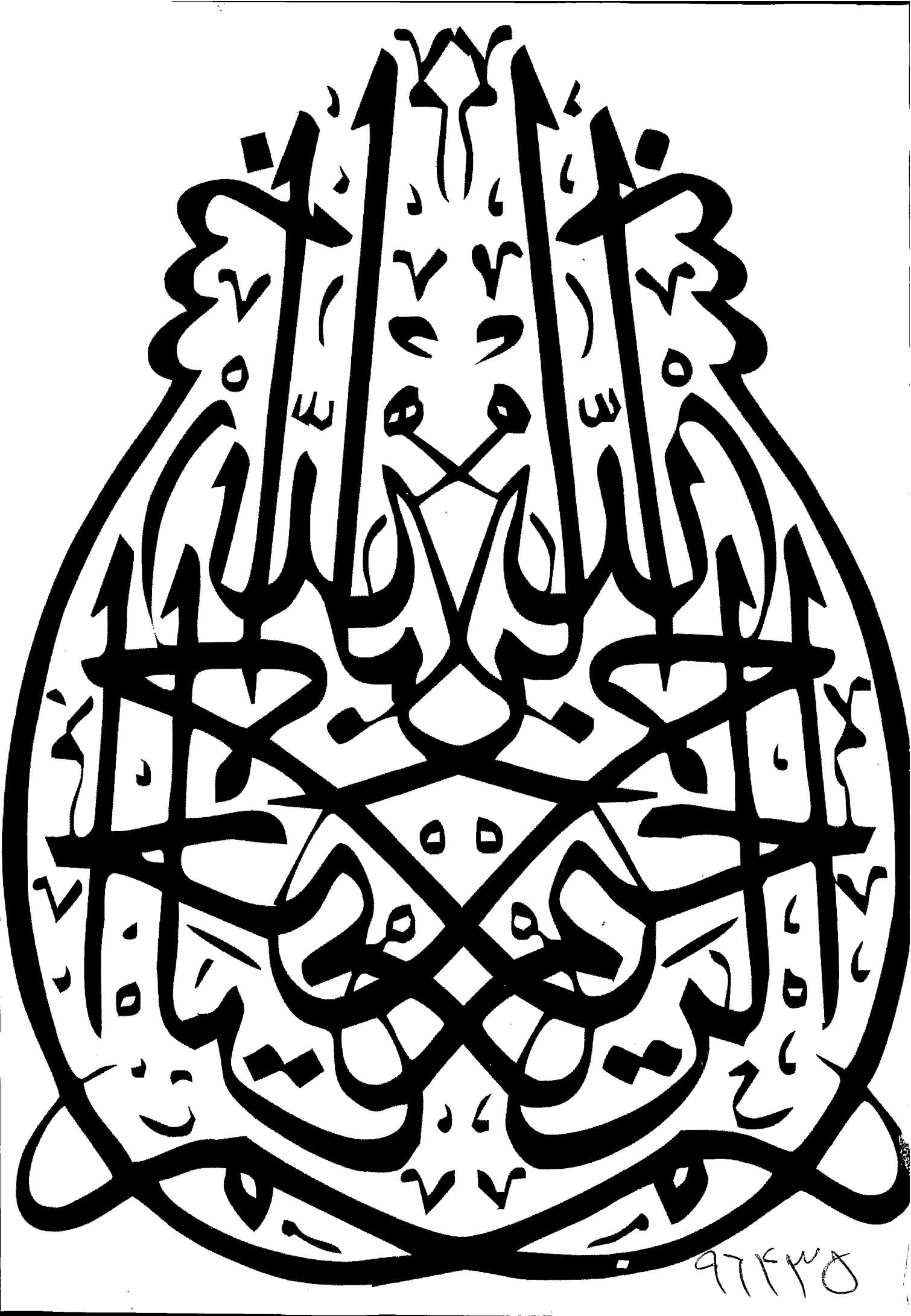

٩٦٤٣٥

سازمان انتقال خون ایران

سازمان انتقال خون

مرکز تحقیقات

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد خون شناسی و انتقال خون

عنوان :

بررسی رابطه ناسازگاری آنتی ژنهای سازگاری نسجی فرعی HA-1 بر وقوع GVHD پس از HSCT

Survey of HA-1(minor histocompatibility) disparity and the acute Graft Versus Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation

مرکز اطلاعات علمی

استاد راهنما:

دکتر مژگان شایگان

اساتید مشاور:

شهرام سمیعی

دکتر کامران علی مقدم

نگارنده :سعید محمدی

اردیبهشت۸۷

۱۳۸۷ /۴/ ۲۸

۹۶۴۳۵

همّتم بدرقه راه کن ای طایر قدس

که بعید است ره مقصد و من نوسفرم

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پـدر و مـادری فـداکار نـصیبم ساخته تا در سایه درخت پر بار وجودشان بیاسـایم و از ریـشه آنهـا شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم ودانش تلاش نمایم .

والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نـشیب آموختند.

آموزگارانی که برایم زندگی؛ بودن و انسان بودن را معنا کردند

حال این برگ سبزی است تحفه درویش تقدیم آنان....

تقدیم به استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر شایگان

به پاس زحمات بی دریغشان

فهرست مطالب:

عنوان شماره صفحه

چکیده فارسی..... ۲
۱-دلایل انتخاب موضوع..... ۳
۲-بیان مسئله..... ۳
۳-تاریخچه کلمات کلیدی..... ۳
۱-۳-آنتی ژنهای سازگاری نسجی فرعی..... ۹
۲-۳-پیوند سلولهای بنیادی خونساز(HSCT)..... ۱۵
۳-۳- (GVHD) Graft Versus Host Disease..... ۲۰
٤-نقد متون..... ۲۸
٥-اهداف کلی واختصاصی..... ۳۱
۱-٥-هدف کلی..... ۳۱
۲-٥-هدف اختصاصی..... ۳۱
٦-متغییرهای تحقیق, ابزار ونحوه سنجش آنها..... ۳۲
۷-نوع مطالعه..... ۳۲
۸-جامعه مورد برررسی,حجم نمونه وروش نمونه گیری..... ۳۳
۸-۱-جامعه مورد برسی..... ۳۳
۸-۲-تعداد نمونه..... ۳۳
۸-۳-روش نمونه گیری..... ۳۳
۹-نحوه اجرای تحقیق..... ۳۳
۹-۱-لیست مواد مورد نیاز..... ۳٤
۹-۲- لیست تجهیزات مورد نیاز..... ۳٤
۹-۳-آماده سازی محلولها..... ۳٥
۹-۳-۱-تهیه بافر٥x TBE..... ۳٥
۱۰-روش ومراحل انجام پژوهش..... ۳٥
۱۰-۱-دریافت نمونهDNA..... ۳٥
۱۰-۲-کنترل کمی وکیفی DNA..... ۳٥
۱۰-۳-انجام مراحل PCR..... ۳٦

۱۰-۳-۱-آماده سازی نمونه DNA ۳۶
۱۰-۳-۲-تهیه محلول Mix ۳۶
۱۰-۳-۳-انجام PCR ۳۷
۱۰-٤-الکتروفورز ۳۸
۱۰-٤-۱-تهیه ژل آگاروز ۲٪ ۳۸
۱۰-٤-۲-تهیه بافر الکتروفورز ۳۸
۱۰-٤-۳-الکتروفورزومشاهده نتایج ۳۸
۱۱-تفسیر نتایج ۳۹
۱۲-بررسی وتحلیل آماری ٤۱
۱۳-محدودیت های مطالعه ٤۱
۱٤-یافته های مطالعه ٤۲
۱۵-بحث ٤۹
۱٦-پیشنهادات ۵۳
فهرست منابع ۵۵

چکیده:

مطـرح شـده کـه ناسـازگاری HA-1 بـین گیرنـده ودهنـده سـلولهای بنیـادی خونـساز بـا بروزGVHD حادارتباط دارد. بنابراین هدف ازاین مطالعه ارزیـابی فراوانـی HA-1 وپـایش ارتباط بین ناسازگاری HA-1 وبروزGVHD دربیماران دریافت کننده پیوند از خواهروبرادربا شباهتHLA بود.

موادوروش ها:

DNA استخراج شده از ۳۰جفت گیرنده- دهنده ایرانی $HLA\text{-}A2^{+}$ که گیرنده مبتلا به GVHD (I-IV) شده و۲۵جفت گیرنده –دهنده که گیرندگان فاقد GVHD بودند،جمـع آوری گردید.تمامی بیماران پیوند سلولهای بنیادی خونساز را از منشاءخون محیطی ،ازخـواهر یا برادربا شباهت HLA دریافت کرده بودنـد.HA-1 بوسـیله روش SSP-PCR شناسـایی شد.تعیین نوع HA-1 با استفاده ازروشSSP انجام گردید.

یافته ها:

فروانی آللهای HA-1R وHA-1H دربیماران بـه ترتیـب ۰,۵۵و۰,۴۵ بـود وعـدم تفـاوت آشکاری با فراوانی این آلل ها در دهندگان ۰,۵۳و۰,۴۷($P>0.05$) را نشان نداد. ناسازگاری HA-1 در ۸ جفت(۱۴,۵٪) از ۵۵جفت گیرنده ودهنده پیوند شناسایی شد.

GVHD بادرجه(I-IV) در۶ بیمار(۷۵٪) از ۸ بیماربـا ناسـازگاری HA-1 رخ داده بود،امـا بین وقوع GVHD حاد درگروه بیماران با ناسازگاری HA-1، هیچ ارتباطی مشاهده نشد.

نتیجه گیری:

علی رغم فراوانی بیشتر ناسازگاری HA-1 در گروه GVHD مثبت،نتایج ما، بازگوکننده ارتباط واضحی بین ناسازگاری HA-1 و خطر بروزGVHD حاد در جمعیـت مـورد مطالعـه نمی باشد.

کلمات کلیدی: GVHD, HA-1, SSP-PCR حاد،آنتی ژن های سازگاری نسجی فرعی، پیوند سلولهای بنیادی خونساز

۱- دلایل انتخاب موضوع

در سالهای اخیر پیوند آلوژن مغز استخوان از خویشاوند یا غیرخویشاوند با شباهت HLA به عنوان درمان مؤثر بسیاری از بدخیمی‌های هماتولوژیک و بیماری‌های غیربدخیم مطرح شده است (۱). GVHD[1] به عنوان اصلی‌ترین عارضه پس از پیوند، حتی در خواهر - برادر (sibling) با شباهت HLA شناخته شده است. بروز موارد شدید آن با درجه بالاتر (II-IV : grade)، در گیرندگان خواهر و برادر با شباهت HLA، بسته به نوع بیماری و نوع داروی سرکوب کننده ایمنی جهت پیشگیری بین ۵۰-۲۰ درصد می‌باشد (۱) و (۲).البته در برخی ازمنابع این مقدار بین ٪٦٦-۱۹ بسته به سازگاری جنس بین گیرنده و دهنده گزارش شده است.(۳)

با توجه به سازگاری آنتی‌ژن های سازگاری نسجی اصلی در پیوند مغز استخوان در گیرندگان sibling، به نظر می‌رسد که عوامل دیگری نیز در بروز این عارضه نقش داشته باشند که از بین آنها می توان به آنتی‌ژن های سازگای نسجی فرعی (mHags)[2] اشاره کرد (٤)و(۲).با توجه به اثراتی که این عارضه بر کیفیت زندگی و ادامه حیات در گیرندگان HSCT[3] می‌گذارد، پرداختن به این عارضه و مطالعه عوامل مؤثر در جهت کاهش آن ضروری به نظر می‌رسد.

لذا بر آن شدیم با انجام این مطالعه که برای اولین بار در افراد ایرانی صورت می‌گیرد، به بررسی ارتباط بین عدم شباهت HA-1 و وقوع GVHD پرداخته تادر صورت مشاهده رابطه،در صورت امکان با رعایت شباهت HA-1 بین گیرنده و دهنده این عارضه را کاهش داده و یا با اطلاع از چنین عدم شباهتی بین گیرندگان و دهندگان پیوند، اقدامات لازم را جهت پیشگیری از بروز GVHD انجام دهیم.

۲- بیان مسئله

GVHD و عود لوکمی دو عارضه اصلی پیوند آلوژن مغز استخوان بین خواهر و برادر با شباهت HLA محسوب می شوند. GVHD در ۲۰-۵۰٪ موارد پیوند بین جفت دهنده و گیرندهٔ با شباهت HLA بسته به نوع بیماری و نوع پیشگیری روی می‌دهد (۱). GVHD

---

1 - Graft Versus Host Disease

2 . Minor Histo compatibility Antigens(or MiHAs)

3 . Heamatopoietic Stem Cell Transplantation

پوستی حاد در بدو شروع به صورت راش‌های دردناک بروز می‌نماید. کبد به عنوان دومین بافت هدف محسوب می‌شود، در این مورد آنزیم‌های LFT[1] کبدی افزایش می‌یابند.در نوع دیگری ازGVHD حاد درگیری بخش انتهایی رودهٔ کوچک ونیز رودهٔ بزرگ ممکن است دیده شود که نتیجه آن اسهال و دردهای شکمی و انسداد روده می باشد. در بیماران با عوارض پیش رونده شانس مرگ و میر ۷۵٪ است و این در حالی است که در بیماران با سیر کندتر شانس مرگ و میر ۲۵٪ می باشد (۳). در جریان بروز GVHD سلولهای T سایتوتوکسیک بافت دهنده قادر به شناسایی آنتی ژن های سازگارفرعی (mHAgs) در بافت گیرنده می‌باشند که این خود حاکی از عملکرد غلبهٔ ایمنی آنتی‌ژن های سازگاری فرعی است(۱). تعریف کلاسیک این آنتی ژن ها از سال ۱۹٤۸ آغاز شد و منشأ آن مطالعهٔ Snell می‌باشد که لوکوس ژنتیکی مسئول رد تومور را توصیف نمود (۵). آنتی‌ژن های فرعی در تحریک رد پیوند به قدرت آنتی‌ژن های سازگاری نسجی اصلی یا MHC[2] یا HLA نمی‌باشند (٦)، اما این آنتی‌ژن ها موانع قابل ملاحظه‌ای در مقابل پیوند مغز استخوان وسلولهای بنیادی ایجاد می‌نمایند (۷) که در ابتدا به عنوان آنتی‌ژن های غیر MHC تلقی شدند. در واقع mHags محصولات ژن های با اشکال متعدد (پلی‌مورفیک) هستند که بین دهنده و گیرنده تفاوت دارند (۸). آنتی‌ژن های فرعی انسانی، پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های داخل سلولی هستند که به صورت طبیعی پردازش شده و بوسیله MHC نوع I و II در سطح سلولها عرضه شده و بواسطهٔ سلول T دهنده شناسایی می‌شوند (۸ و۹). ناسازگاری در آنتی‌ژن های فرعی عمدتاً به علت پلی‌مورفیسم در اسیدآمینه ذر این پروتئین‌های خودی است ولی در برخی موارد می‌تواند به علت حذف ژنی نیز بوجود بیاید(۸). در واقع مولکولهای MHC پروتئین‌های متصل به پپتیدهایی هستند که برخی از این پپتیدهای خودی همان mHags بوده و این لیگاندها عمدتاً حاصل تجزیه جزئی پروتئین‌های خودی داخلی (endogenous)، که در قسمت‌های مختلف سلول منتشرند، می‌توانند بین افراد با شباهت MHC (HLA)، پاسخ سلول T را آغاز نمایند (۱۰). دخالت احتمالی آنتی‌ژن های mHags در پیوند در انسان از سال ۱۹۷٦ توسط Goulmy مطرح شد. این نظریه با مشاهدهٔ بالینی بیمار مؤنث دریافت کنندهٔ پیوند مغز استخوان از برادر با شباهت HLA مطرح گردید. بررسی‌های آزمایشگاهی لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مؤنث (پس از پیوند) نشان دادند که پاسخ‌های قوی لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک برای سلولهای دهندهٔ

1 . Liver Function Test
2 . Major Histocompatibility Complex

مذکر با شباهت HLA (HLA-identical) اختصاصی هستند (۵). ژن‌های کدکنندهٔ mHags در هر دو دهنده و گیرنده وجود دارند، اما در نواحی کدکننده متفاوت می‌باشند(۱۱). به علت تعداد زیاد، (۷۲۰ عدد در موش و بیش از آن در انسان) فقط دوقلوهای همسان دارای تشابه در همه آنتی‌ژن های پیوندی هستند و خواهر و برادر با شباهت HLA فقط در نیمی از این آنتی‌ژن ها دارای تشابه می‌باشند (۱۲) و از این رو است که درصد بروز GVHD در موارد غیر sibling ، با شباهت HLA، ٦٤ درصد افزایش می‌یابد. بروز موارد شدید GVHD با درجه بالا در گیرندگان خواهر و برادر با شباهت HLA، بسته به نوع بیماری و نوع داروی سرکوب کننده ایمنی جهت پیشگیری بین ۲۰-۵۰٪ می‌باشد. آنتی‌ژن HA-1، آنتی‌ژنی محدود به $HLA\text{-}A_2$ است (۱۳) و دارای ۲ آلل $HA\text{-}1^H$، $HA\text{-}1^R$ است که محصولات آنها در جایگزینی هیستیدین با آرژنین می‌باشند (١٤ و ١٣). آلل HA-1R یک آلل خنثی می‌باشد. این آلل یا توانایی تولید محصول را ندارد و یا محصول تولیدی به قدری کم است که قابلیت اتصال به $HLA\text{-}A_2$ را ندارد و از سویی دارای قدرت آنتی ژنسیته پائین است. از این رو حضور آنتی ژن $HA\text{-}1^R$ در گیرنده و عدم حضور آن در دهنده قادر به تحریک سلولهای T سایتوتوکسیک دهنده نمی‌باشد (۱۵).

خواهر و برادر ناسازگار از نظر mHags، احتمالاً دارای یک یا هر دو والد هتروزیگوت از لحاظ این آنتی ژن ها می‌باشند. در صورتی که دهنده برای یک آلل mHags هتروزیگوت و گیرنده هتروزیگوت و یا هموزیگوت و نامشابه با دهنده باشد، جفت ناسازگار خوانده می‌شود..به عبارتی در ارتباط با آنتی ژن HA-1 ناسازگاری زمانی مطرح می شود که گیرنده هموزیگوت (HA-1H/H) و یا هتروزیگوت (HA-1H/R) ولی دهنده تنها دارای فرم هموزیگوت (HA-1R/R) و فاقد آنتی ژن HA-1H باشد.(۱و۱۳)

ناسازگاری HA-1 در گیرندگان غیرانتخابی، بین خویشاوندان ۵-۱۰٪ است و در بین غیرخویشاوندان ۲۰-۵۰ درصد است (١٦). در مطالعه‌ای که در مرکز دانشگاهی Liden صورت گرفته است، نشان داده شد که ١٦ درصد از جمعیت مورد مطالعه برای $HA-1^{H/H}$ هموزیگوت و ٥٤درصد $HA-1^{H/R}$ هتروزیگوت هستند و ۳۰ درصد از این جمعیت مورد مطالعه از لحاظ HA-1R هموزیگوت می‌باشند (به عبارتی $HA-1^{R/R}$ می‌باشند). ۷۰ درصد از جمعیت سفید پوست $HLA\text{-}A2^+$ مورد مطالعه، دارای آنتی ژن $HA\text{-}1^+$ ($HA\text{-}1^{H/H}$ یا $HA\text{-}1^{H/R}$) و ۳۰ درصد افراد با HLA-A2 فاقد $HA\text{-}1^{H/H}$ می‌باشند

($HA-1^{R/R}$). از این رو می‌توان گفت که در پیوند مغز استخوان بین خواهر و برادرها ۷۰ درصد احتمال سازگاری HA-1 بین گیرنده و دهنده وجود دارد و تنها در ۳۰ درصد موارد ناسازگاری دیده می‌شود. هر چند Borssart و همکارانش گزارش کرده‌اند که ناسازگاری HA-1 تنها در ۱۳٪ موارد پیوند sibling دیده می‌شود (۱۷). از بین جمعیت ناسازگار بسته به نوع پیشگیری و نوع بیماری بین ۲۰-۵۰ درصد احتمال بروز GVHD با درجه II-IV وجود دارد (۲و ۱). در بیماران با ناسازگاری HA-1 در مقایسه با موارد سازگار درگیری پوستی و روده‌ای با درجهٔ بالا بیشتر دیده می‌شود ولی درگیری کبدی در هر دو یکسان است (۱۶).

در مطالعه‌ای که Goulmy و همکارانش در سال ۱۹۹۶ بر روی ۱۴۸ بیمار دریافت کنندهٔ پیوند مغز استخوان از خواهر یا برادر برای بررسی آنتی ژنهای مینور HA-1,-2,-3,-4,-5 انجام دادند،دریافتند که رابطهٔ آشکاری بین GVHD و عدم سازگاری آنتی ژن HA-1 و HA-2,4,5 هر یک به تنهایی یا با همراهی یکدیگر در بالغین وجود دارد ولی چنین ارتباطی در کودکان به اثبات نرسید. از سوی دیگر ارتباط بین HA-3 که توسط HLA-A1 عرضه می‌شود با بروز GVHD به اثبات نرسید (۱۹ و ۱۸). از سال ۱۹۹۶ به بعد مطالعات مختلفی در این زمینه صورت گرفته است، که غالب آنها دلالت بر ارتباط تنگاتنگ ناسازگاری HA-1 با بروز GVHD با درجه (II-IV) دارد. البته گزارشات متناقضی نیز در ارتباط با عدم وجود رابطهٔ آشکار بین بروز GVHD و عدم سازگاری HA-1 نیز مطرح شده است. در مطالعه‌ای که توسط Ming-tseh lin و همکارانش صورت گرفته است، ارتباط آشکار بین HA-1 و GVHD را رد نکرده است (۲۰).

S.Nesci و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعه‌ای را بر روی ۹۴ بیمار تالاسمیک در مرکز هماتولوژی و انکولوژی persaro در ایتالیا (۱)، و Gesin kigler و همکاران در سال ۲۰۰۲ طی مطالعه‌ای بر روی ۱۱۵ بیمار دریافت کنندهٔ HSCT از منشاء خون بند ناف انجام دادند در این مطالعه وجود ارتباط بین HA-1 و بروز GVHD تایید نگردید(۲۱).

در سال ۲۰۰۶F.E.bertinetto و همکارانش مطالعه ای را بر روی ۷۷ بیمار دریافت کنندهHSCT از دهندهSibling با شباهتHLA انجام دادند،آنها نیز در مطالعه عدم ارتباط بین HA-1 و بروز GVHD را گزارش نمودند(۲۲).

Li-Hui-Tseng و همکارانش در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ انجام دادند، با بررسی توزیع درگیری ارگانهای بافتی دریافتند که درگیری پوستی و روده‌ای با درجه بالا در بیماران با

ناسازگاری HA-1 در مقایسه با بیماران بدون ناسازگاری HA-1 بیشتر است, ولی درگیری کبدی در هر دو گروه یکسان است. این یافته می تواند دال بر این واقعیت باشد که توزیع بافتی آلوآنتی ژن در گیرنده، ممکن است بر تظاهرات بالینی GVHD مؤثر باشد. از سویی آنها گزارش کردند که بیماران با ناسازگاری HA-1 دارای بدخیمی پیشرفته‌تری نسبت به موارد بدون ناسازگاری HA-1 می‌باشند و نیز بیماران با ناسازگاری HA-1 بیشتر در معرض عود لوکمی ، فاز تشدید شونده یا فاز بلاستی در زمان پیوند هستند.با توجه به مطالعه فوق که بین ناسازگاری HA-1 وخطر بروزGVHD (با P=۰,۰۸ و CI=۰,۹۵)رابطه ای را مطرح نمودند(۱٦)،در مطالعه بعدیLi-Hui-Tseng, وMing-Tseh Linدر سال ۲۰۰۱احتمال رابطه بین ناسازگاری HA-1 وافزایش خطرGVHD را رد نکردند. (۲۰) حذف لنفوسیت‌های T (T-cell depletion)از بافت پیوندی منجر به جلوگیری از GVHD می‌گردد، اما منجر به بروز عود لوکمی نیز می‌شود، به عبارتی GVHD با کاهش عود لوکمی پس از BMT همراه است.(۸) لنفوسیت‌های T دهنده که باعث GVHD می‌شوند، ممکن است فعالیت اجرایی ضد تومور داشته باشند (۲۳و۱۹و۱۵و۸).

پاسخ ایمنی همراه با پیوند آلوژنیک مغز استخوان، بر علیه سلولهای توموری باقیمانده پاسخ پیوند علیه لوکمی اطلاقGraft Versus Leukemia)می‌شود(۲۳ و ۸). همراهی GVL با GVHD، دلالت بر نقش سلولهای T واکنش دهنده با MHags بیان شده بر روی سلول گیرنده دارد (۲٤و ۲۳). ناسازگاری آنتی ژن های HA-1 در زوجهای پیوندی نه تنها منجر به بروز GVHD می‌شود، بلکه می‌تواند پاسخ GVLرا نیز برانگیزد. امروزه از این خاصیت جهت جلوگیری از عود لوکمی به دنبال پیوند آلوژن استفاده می‌شود (۲۵و ۲۳و ۱۷).

برای بررسی HA-1 از ۵ روش که همگی مبنای مولکولی دارند و در آنها از DNA استفاده می‌گرددو این روشها عبارتند از (۱٤) :

۱- SSP-PCR(Sequence specific primer-PCR)

۲- RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

۳-RT-PCR(Riverse Transcription –PCR)

٤-RSCA(Reference Standard mediate Comfirmation Analysis)

۵- ASFLP(Allel Specifice Flurosence-Labelled Probes)

با توجه به مطالعه تأثیر آنتی ژن های HA-1 بر وقوع GVHD، گزارش‌های نامتناقض در این زمینه و هم چنین، عدم بررسی این آنتی ژن ها در بین گیرندگان واهداکنند گان سلولهای بنیادی خونساز در کشور و عدم وجود اطلاعات در این زمینه بر آن شدیم تا به بررسی مولکولی این آنتی ژن ها بین خواهران و برادران دهنده و گیرندهٔ سلو لهای بنیادی خونساز (HSCT) در رابطه با وقوع و یا عدم وقوع بپردازیم. در این تحقیق از روش SSP-PCR جهت بررسی مولکولی آنتی ژن HA-1 و تعیین ارتباط آن با بروز GVHD و شدت آن در ۵۵ جفت نمونه گیرنده و دهندهٔ (sibling) خواهر و برادر با شباهت، HLA-A2 که در طی سالهای ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵ در مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی وپیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر علی شریعتی تحت عمل HSCT قرار گرفته‌اند، که حداقل نیمی از گیرندگان پیوند عارضه GVHD را با درجات مختلف بروز داده‌اند، استفاده شد.

تصور بر آن است، در صورتی که بتوان رابطهٔ بین این دو عامل را در آنان نشان داد، شاید بتوان از طریق تعیین این آنتی ژن قبل از پیوند بین جفت‌های دهنده و گیرنده‌ای که از طریق تعیین HLA مناسب پیوند شناخته شده‌اند، به عنوان یک عامل پیش آگهی دهنده به درمان به موقع GVHD پرداخت. از سویی با توجه به بروز اختصاصی HA-1 بر روی سلولهای بنیادی، امکان بهره‌برداری در ایمنوتراپی نیز وجود دارد. به عبارتی با یافتن ارتباط ناسازگاری HA-1 در زوجهای پیوندی با بروز GVHD از یک سو می توان پیشگیری‌های لازم را در جهت جلوگیری از GVHD انجام داد و از سوی دیگر می‌توان با شناسایی این ناسازگاری بین زوجهای پیوندی از تزریق لنفوسیت‌های دهنده (DLI)[1] جهت به راه انداختن پاسخ GVL و جلوگیری از عود لوکمی بهره‌برداری کرد.

1-Doner Lymphocyte Inffusion

۳- تاریخچه کلمات کلیدی

۱-۳- آنتی ژن های سازگاری نسجی فرعی

شناسایی اولیه آنتی ژن های سازگاری نسجی فرعی که با علایم اختصاری متعددی از قبیل : (MiHA, MHags, mHC) نشان داده شده است به علت نقش آنها به عنوان سدهای سازگاری در رد پیوند ممکن گردید. اصطلاح minor یا فرعی برگرفته از آن است که در تجربیات پیوند پوست در موش، الگوهای رد پیوند ناشی از لوکوس‌های ژنتیکی مختلف با الگوهای رد بافت پیوندی که ژن‌های مربوطه فقط در لوکوس H2 (مجموعه سازگاری نسجی اصلی موش) قرار دارند، مقایسه شده‌اند. تعریف کلاسیک mHags از سال ۱۹٤۸ آغاز گردید و منشأ آن مطالعهٔ snell می‌باشد که لوکوس ژنتیکی مسئول رد تومور را توصیف نمود (٦).

دخالت احتمالی آنتی ژن های mHags در پیوند در انسان از سال ۱۹۷٦ توسط Goulmy مطرح شد. این نظریه با مشاهدهٔ بالینی بیمار مؤنث دریافت کنندهٔ پیوند مغز استخوان از برادر با شباهت HLA مطرح گردید. از آن تاریخ به بعد مطالعات مختلفی صورت گرفته که منجر به کشف آنتی‌ژن های مینور جدیدتری گردیده است.آنتی ژن های مینور یا فرعی به دو دسته مهم تقسیم می‌شوند :

۱- آنتی ژن های کلاسیک : آنتی‌ژن های سازگاری نسجی فرعی روی کرموزوم Y (آنتی ژن های HY و آنالوگ‌های آن بر روی کرموزم X) و آنتی ژن های اتوزومال HA-1,-2,-3, 4,-5,-6,-7,-8 و HB-1. آنتی ژن های کلاسیک بوسیلهٔ سلول T محدود به MHC شناسایی می‌شوند (٦).

۲- آنتی ژن های مدرن : CD_{31} یا[1] PECAM و آنتی ژن های پلاکت انسانی (HPA)[2] (۷). آنتی ژن های مدرن محصولات پلی مورفیسم (چندشکلی) هستند که در فعالیت مرتبط با پیوند نقش دارند (٦). آنتی ژن های سازگاری فرعی (mHags) از نظر ظهور بافتی متفاوت می‌باشند. دسته‌ای از آنتی ژن های فرعی بر روی سلولهای مختلفی بیان می‌شوند، در حالی که دسته‌ای دیگر از این آنتی‌ژن ها تنها دارای بیان منحصر به فرد بر روی سلولهای خاصی می‌باشند (۸).

---

1 Platelet Endothelial Cell Adhision Molecule
2 . Humman Platelet Antigen

به عنوان مثال آنتی ژن های HA-3,-4,-5,-6,-7 بوسیلهٔ سلولهای خونساز، سلولهای اپی تلیال، سلولهای فیبروبلاست بیان می‌شوند و آنتی ژن های HA-1,-2 تنها در سطح سلولهای ردهٔ خونساز بیان می‌شوند (۲٤). آنتی ژن های HA-1 در برخی کارسینوماها دارای بیان نابجا در سطح سلولهای اپی‌تلیال می‌باشند که از این خاصیت امروزه جهت درمان برخی کارسینوماها با استفاده از پیوند آلوژن مغز استخوان از دهندگان با شباهت HLA و نیز ایمنوتراپی خاص HA-1 استفاده می‌شود (٤).

آنتی ژن های کلاسیک:

۱-آنتی ژن های HA

الف) HA-1 : آنتی ژن HA-1، آنتی ژن مینور محدود به HLA-0201/21/103 می‌باشد که بوسیله ژن اتوزمال KIAA0223 روی کرموزم ۱۹ کد می‌شود و با HA-2 شباهت دارد (۱۳). HA-1 بر روی سلولهای سرطانی اپی تلیال (و نه اپی تلیال طبیعی) حضور دارد (۲۵). HA-1 در فعالیت GVLنیز دخالت دارد (۲۳، ۱۷، ۸). HA-1 بر روی سلولهای حرفه‌ای عرضه‌کنندهٔ آنتی ژن نظیر دندریتیک سل (DC^1) هم دیده می‌شود (۲٦ و ٦). آنتی ژن HA-1 یک نانوپپتید است که توسط ژن KIA0223 کد می‌شود. این ژن پلی مورفیک دارای دو آلل شناخته شده با توالی متفاوت DNA در موقعیت ۵۰۰ و ۵۰٤ ژنوم است که منجر به بروز پلی مورفیسم در یک اسیدآمینه می‌شود (۱۳). آلل HA-1 دارای ۲ اگزون B و A است که تفاوت در دو نوکلئوتید انتهای '۳ اگزون A در موقعیت ۵۰۰ و ۵۰٤ این دو آلل را از هم جدا می‌کند (۲۷). جایگزینی هیستیدین با آرژنین در سومین اسید آمینه صورت می‌گیرد (۱۳).

Tseng و همکارانش دریافتند که در آلل $HA\text{-}1^H$ در موقعیت ۵۰۰ سیتوزین و در موقعیت ۵۰٤ آدنین قرار دارد و در آلل $HA\text{-}1^R$ در موقعیت ۵۰۰ تیمیدین و در موقعیت ۵۰٤ گوانین قرار می‌گیرد (۱٤) (۱۳). در مطالعات صورت گرفته توسط Arastegui-Ji در مرکز بیمارستانی Duran در بارسلونای اسپانیا، با استفاده از روش RSCA مشخص گردید در آلل $HA-1^H$ حذف ۵ جفت باز (5bp) در اینترون در موقعیت ۲۱۸ تا ۲۱٤ دیده می‌شود که مختص $HA-1^H$ است و در $HA-1^R$ دیده نمی‌شود و از این حذف می‌توان در شناسایی این آلل استفاده کرد (۲۷). وفور آلل $HA-1^H$ ۷۰ درصد (۱٦ درصد هموزیگوت $HA-1^{H/H}$ و

1 . dendritic cell

٥٤ درصد هتروزیگوت : ($HA-1^{H/R}$) و $HA-1^{R}$ ۳۰ درصد می‌باشد (۱۷و ١٤). سکانس پپتیدی که بوسیلهٔ آلل $HA-1^{H}$ (VLDDLLEA) کد می‌شود، توسط HLA-A0201 به سلولهای T سایتوتوکسیک عرضه می‌شود (۱۳و۱). آلل $HA-1^{R}$ به عنوان یک آلل خنثی (Null) با فعالیت محدود به سلول T سایتوتوکسیک مورد توجه قرار دارد. این آلل یا توانایی تولید محصول ندارد, و یا این که محصول تولیدی آن به قدری کم است که قابلیت اتصال به مولکول HLA-A2 را ندارد و از این رو دارای قدرت آنتی‌ژنسیتهٔ بسیار ناچیز است (۱). براساس مطالعات صورت گرفته در هر سلول بیش از ٥ کپی از ژن $HA-1^{R}$ وجود دارد که قادر به تولید محصول قابل اتصال با HLA-A2 نمی‌باشد.(۸)

جایگزینی هیستیدین با آرژنین منجر به ناسازگاری HA-1 بین دهنده و گیرنده می‌شود که در صورت عرضه در سطح HLA-A2 باعث القاء سلولهای T سایتوتوکسیک می‌گردد. ناسازگاری بین HA-2 و HA-1 و HA-4 و HA-5 با افزایش شیوع GVHD همراه است (۱۸). بررسی‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر HLA-A0201/21/103 سایر آلل‌های HLA-A نیز می‌توانند به پپتید $HA-1^{H}$ اتصال یابند، اما قادر به اتصال به پتید $HA-1^{R}$ نمی‌باشند. علاوه بر آنتی‌ژن های HLA-A، سکانس پپتیدی جدیدی از $HA-1^{H}$ (KECVLHDDL) محدود به HLA-B60 شناسایی شده است که ایمنی‌زا می‌باشد. توانایی ایمنی‌زایی پپتید (KECVLRDDL) که مربوط به $HA-1^{R}$ است در مولکول HLA-B 60 تأیید نشده است (۸).

براساس مدل‌های آلل‌های HLA می‌توان آنها را براساس واکنش با پتیدهای HA-1 به چهار گروه تقسیم نمود :

۱- قابل اتصال به پپتید $HA-1^{H}$ و غیرقابل اتصال به پپتید $HA-1^{R}$

۲- قابل اتصال به پپتید $HA-1^{R}$ و غیرقابل اتصال به پپتید $HA-1^{H}$

۳- قابل اتصال به هر دو پپتید

٤- غیرقابل اتصال به هر دو پپتید

ب) آنتی ژن HA-2 : این آنتی ژن بوسیله ژن کلاس II میوزین کد می‌شود (myo IG)،ژن myo IG روی بازوی کوتاه کرموزوم ۷ قرار دارد و ظهور این ژن محدود به سلولهای با منشأ خونسازمی باشد(٢٤)دو آلل این ژن شناسایی شده‌اند: $myo\ IG^{V}$ و $myo\ IG^{M}$ اولی سکانس پپتیدی YIGEVLVSV را کد می‌کند و دومی کدکنندهٔ سکانس پپتیدی YIGEVLVSM

می‌باشد. این تغییر اثر اندکی بر اتصال به پپتید HLA-A0201 و شناسایی بوسیله سلولهای T اعمال می‌کند (۲۸، ۷). HA-2 دو آلل دارد که وفور آنها در افراد سالم ۹۵٪ و ۵٪ می‌باشد (۹). این آنتی ژن ها نیز همانند HA-1 غیروابسته به کرموزومهای جنسی هستند و به صورت کلاسیک با محدودیت به HLA-A2 شناسایی می‌شوند.

ج) از دیگر آنتی ژن های کلاسیک می‌توان به HA-3 و HA-4 و HA-5 اشاره نمود که در جمعیت سالم، به ترتیب با فراوانی ۸۸٪و۱۶٪ و ۷٪ دیده می‌شوند (۲۹).

د) آنتی ژن HA-8 : که بوسیله ژن KIAA0020 کد می‌شود و محدود به HLA-A2 می‌باشد(۲۶). به عبارتی HA-8 بوسیله HLA-A0201 و یا HLA-A0202 عرضه می‌گردد. گزارش گردید که عدم شباهت HA-8 در ٦٤٪ از ۷۲ گیرنده سلولهای بنیاد خونساز باعث GVHD با درجات II-IV شده است (۱۱).

۲-آنتی ژن های HB-1

دارای دو آلل $HB\text{-}1^{H}$ و $HB\text{-}1^{y}$ می‌باشد که فراوانی آنها به ترتیب ۷۹٪ و ۲۱٪ می‌باشد (۹). تفاوت نوکلئوتیدی در این دو آلل باعث جایگزینی هیستیدین در ($HB\text{-}1^{H}$) با تیروزین د ر($HB\text{-}1^{y}$) می‌شود. آلل $HB\text{-}1^{H}$ سکانس اسید آمینه EEKRGSLHVW اپی‌توپ سلول T را کد می‌نماید. براساس مطالعات Bolostra و همکارانش سلولهای T سایتوتوکسیک آنتی ژن HB-1 را در مجاورت $HLA\text{-}B_{44}$ شناسایی می‌کنند. آنتی ژن های HB-1 بر روی زیرردههای خاصی از سلولهای خونساز بیان می‌شوند. ژن کدکنندهٔ HB-1 به طور انتخابی در سطح سلولهای B آلوده با EBV و سلولهای ALL - B شناسایی شده است ولی در سطح سلولهای طبیعی وجود ندارد (۲٤).

۳-آنتی ژن های H-y

mHags کد شده بوسیلهٔ کرموزم Y، در انسان و موش، مشخص شده‌اند. ژن‌های روی کرموزوم Y که این آنتی ژن ها را کد می‌کنند شامل : SMCY ، UTY ، DFFRy و DBY (یا Dby) می‌باشند (۲٦ و ۱۱). به mHags کد شده بوسیله ژن‌های مستقر بر روی کرموزوم Y، آنتی ژن های H-Y اطلاق می‌شود (۳۱ و ۳۰) آنتی ژن H-Y توسط HLA-A1 و HLA-A2 و HLA-B7 بیان می‌شود و در هر دو دسته ردهٔ سلولهای خونساز و غیرخونساز یافت می‌شود

(۲٤). اولین ژن شناخته شده که mHags با محدودیت HLA- B7 و HLA- A2 را کد می‌نماید، Smcy یا SMCY می‌باشد.(۳۱) سه آنتی ژن فرعی H-Y که بوسیله HLA-B7 و HLA-A2 و HLA-A1 عرضه می‌شوند، بر روی هر دو سلول خونساز و غیرخونساز وجود دارند، پاسخ سلول T به این آنتی ژن ها ممکن است باعث وساطت GVHD به همراه GVL شود (۲٦). توجه به این نکته ضروری است که سلول T سایتوتوکسیک بر علیه H-Y عرضه شده بوسیله HLA-B7 تنها قادر به لیز بلاست‌های لوکمیک است و قادر به لیز سلولهای فیبروبلاست پوست نمی‌باشد، که این حاکی از محدودیت بیان این دسته از آنتی‌ژن های H-Y به بافت خونساز است. UTY دستهٔ دیگری از ژن های کرموزم Y است که یکی از H-Yها را کد می‌کند. این پپتید بر روی HLA-B8 عرضه می‌شود و روی اکثر سلولهای خونسازو به میزان کمتری بر روی بافت غیر خونساز ابراز می شود. توالی آمینواسید دو آنتی ژن H-Y بوسیله الوشن مرتبط با توالی کد شده بوسیله ژن SMCY شناسایی شده که در ۸۵٪ از توالی آمینو اسید با ژن هموزیگوت کرموزم X (smcx) یکسان می‌باشد. اپی توپSMCY محدود به HLA-A2 (FKDICQV) حاوی تغییر در سیستئین انتهایی درموقعیت ۷ می باشد. آنتی ژن سوم H-Y که توسط HLA-A1 عرضه می‌شود محصول ژن DFFRY است (۲٤).

مشابه ژن UTY ژن UTX است که بوسیله کرموزوم X کد می شود. پپتید دیگری از UTY کشف شده است که توسط HLA-B80 عرضه می‌شود. لذا UTY ممکن است به عنوان یکی از موارد کاربرد برای پاسخ GVL درگیرنده مذکر با اهداءکنندهٔ مؤنث محسوب شود (۲٦).

آنتی ژن های مدرن

CD31-1 : یا (PECAM) (Platelet Endothelial Cell Adhision Molecule)

از مولکول های چسبندگی یا چسبان می‌باشد، ظهور وسیعی داشته و بر روی سلولهای اندوتلیال عروق ،سلولهای بنیادی مغز استخوان، پلاکت‌ها و گلبولهای سفید ظاهر می‌شوند (٦). نظرات متناقضی در مورد آنتی‌ژن سازگاری نسجی فرعی بودن و نقش CD31 در GVHD وجود دارد، برخی محققین CD31 را یک mHag تصور نموده و اطلاعات برخی مؤید این امر نمی‌باشد (۳۳، ۳۲). گزارش شده که عدم شباهت CD31، یک اثر واضح در بروز GVHD مزمن نشان داده اما از نظر آماری به عنوان عامل خطر شناخته نشده است، ولی در

گزارش دیگر به عنوان عامل خطر GVHD حاد در پیوند بین sibling شناخته شده است (۲۶، ۱۹). پلی‌مورفیسم ذکر شده برای CD31 در سه کدون تعریف شده‌اند که شامل:
۱- اگزون ۳ (کدون ۸۰ : والین در آلل $CD31^V$ جایگزین با لوسین در آلل $CD31^L$).
۲- اگزون ۸ (کدون ۵۳۶ : سرین در آلل $CD31^S$ جایگزین با آسپارژین در آلل $CD31^N$).۳- اگزون ۱۲ (کدون ۶۷۰ : آرژنین در آلل $CD31^R$ جایگزین با گلوتامین در آلل CD31) می‌باشد (۳۳ و ۶).

در مورد اهمیت نسبی کدون‌های پلی مرفیک در مولکول CD31 و اثر بر GVHD اتفاق نظر وجود ندارد. گزارشاتی مبنی بر ارتباط کدون ۱۲۵ با GVHD ارائه شده است. Mayuya و همکاران همبستگی پلی مورفیسم CD31 در کدون ۵۳۶ و ۶۷۰ با یکدیگر و نقش ناسازگاری آنها را در افراد ژاپنی HLA-B66 مثبت مطرح نمودند (۶). Garment نیز بیان نمود که ممکن است پلی مورفیسم ۶۷۰ و ۵۶۳ اثر قوی‌تری نسبت به پلی مورفیسم کدون ۱۲۵ داشته باشد (۳۳).

Beher و همکاران رابطهٔ بین GVHD و عدم سازگاری در مولکول CD31 (کدون ۱۲۵)، را گزارش نمودند. در ۶۷٪ از گیرندگان که از خواهر یا برادر شبیه از نظر HLA و با عدم شباهت CD31 پیوند دریافت نموده‌اند، GVHD گسترش یافت. در حالی که نیکولاس و همکاران عدم رابطهٔ آشکار بین ناسازگاری کدون ۱۲۵ و گسترش GVHD در ۳۰۱ بیمار تحت مطالعهٔ خود را گزارش کردند .(۳۴)

۲-آنتی ژن های پلاکتی انسانی (Human platelet Antigens) :

آنتی ژن های پلاکتی بر روی گلیکوپروتئین های مختلف سطح پلاکت مستقر می‌باشند. این گلیکوپروتئین‌ها که به خانوادهٔ اینتگرین تعلق دارند، مجموعه‌های غشایی حاوی دو زنجیرهٔ α و β می‌باشند و در واکنش‌های چسبندگی شرکت می‌نمایند. تصور می‌شود که HPA ها منحصر به پلاکت‌ها و مگاکاریوست‌ها هستند که اصطلاحاً به آنها آنتی ژن های اختصاصی پلاکتی اطلاق می‌گردند، اما از آنجا که این آنتی ژن ها اپی توپ‌های روی اینتگرین‌ها هستند، برخی از آنها بر روی سلولهای اندوتلیال عروقی، فیبروبلاست‌ها و سلولهای عضلات صاف نیز حضور دارند(۳۵).