

بررسی مولکولی آللهای *DQB1*، *HLA-DRB1* در مبتلایان به کیست هیداتیک

مهدی مسیبی¹، عبدالحسین دلیمی اصل²، سید محمد موذنی³، قاسم مسیبی⁴

1- دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

2- استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

3- استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

4- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

یافته / دوره نهم / شماره 3 / پاییز 86 / مسلسل 33

چکیده

دریافت مقاله: 86/5/1، پذیرش مقاله: 86/7/29

مقدمه: هیداتیدوز یکی از بیماریهای انگلی مهم است که با استقرار مرحله لاروی کرم اکینووکوس گرانولوزوس سگ در میزبانان علفخوار واسط مثل گوسفند و گاو... و هم چنین انسان، ایجاد می شود. تفاوت در حساسیت و مقاومت به ابتلا و عود در بیماریهای عفونی از جمله کیست هیداتیک و آلوئولار در حیوانات و انسان دیده شده است که به دلیل تفاوت در فاکتورهای فردی و پاسخهای ایمنی، مبتنی بر تفاوت در ژنهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت های انسان و یا حیوان، می باشد. هدف از این تحقیق که برای اولین بار در ایران بر روی بیماران هیداتید انجام می شود، بررسی آللهای *DRB1* و *DRB1* لوکوسیت انسان در منطقه است که در ایجاد مقاومت یا حساسیت به آلودگی کیست هیداتیک نقش دارند.

مواد و روشها: برای شناسایی آللهای *DQB1* (23 واکنش)، *DRB1* (8 واکنش) با استفاده از ژنوم انسانی، 56 بیمار ایرانی مبتلا به کیست هیداتیک تشخیص داده شده و یا جراحی شده و 30 فرد سالم با روش PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer) آزمایش شدند. DNA نمونه ها از خون کامل تخلیص گردید و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. پس از الکتروفورز محصول روی ژل آگارز نتایج با دستگاه UV خوانده و آللهای شناسایی شده، ثبت شد. آنالیز نتایج مولکولی ابتدا با استفاده از نرم افزار INNO TRAIN و جداول فراوانی و تفسیر آنها برای تعیین ترکیب آلی (Allele Combination) انجام و پس از آن آزمون همگنی با استفاده از χ^2 و تست دقیق فیشر انجام شد. برای نمونه های معنی دار تحلیل رگرسیون لجستیک انجام و Odds - ratio آنها محاسبه گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که از بین ژنهای بررسی شده *DRB1*، *DQB1* در بیماران و افراد سالم فراوانی آلل *DQB1*03* با اختلاف معنی داری در گروه غیر هیداتیدی بالاتر است ($P < 0.02$) و ($Odds\ ratio = 2/87$). مصونیت این افراد در صورت مواجهه با عامل بیماری در مقایسه با افراد فاقد این آلل حدود 2/87 برابر می باشد و دارندگان این آلل مقاومت بیشتری در برابر استقرار و رشد کیست هیداتیک تک حفره ای دارند.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه اختلاف زمینه های ژنتیکی افراد در ابتلا به کیست هیداتیک را در منطقه مورد بررسی نشان داد و مشخص کرد که آلل *DQB1*03* در ایجاد مقاومت بیشتر در برابر استقرار و رشد کیست هیداتیک تک حفره ای نقش دارد. مطالعات تکمیلی با روشهای مولکولی با قدرت تفکیک بالاتر پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: کیست هیداتیک، *DRB1*، *DQB1*، آنتی ژن لنفوسیت انسان، آلل، PCR-SSP.HLA

آدرس مکاتبه: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

پست الکترونیک: Dalimi4@yahoo.com

مقدمه

هیداتیدوز یکی از آلودگیهای انگلی مهم است. سگ سانان میزبان اصلی (نهایی) و علفخواران میزبان واسط اصلی آن هستند و انسان با خوردن تخم انگل از طریق آب، سبزیجات، مواد غذایی و یا تماس با سگ بطور اتفاقی به مرحله لاروی آن (کیست هیداتیک) به عنوان میزبان واسط غیرفعال مبتلا می شود. در روده، جنین (انکوسفر) از تخم خارج شده و از طریق خون به بافت های مختلف رفته و در آنجا به فرم لاروی کرم که به صورت کیست است در می آید. معمولا آلودگی دامها به کیست هیداتیک منجر به کاهش قابل ملاحظه ای در محصولات دامی (گوشت، شیر و پشم و ...) می شود. اهمیت بهداشتی هیداتیدوز در انسان به علت هزینه های بیمارستانی، تشخیصی، جراحی، از کارافتادگی، ناتوانیهای جسمی و حتی مرگ می باشد. بیماری تقریبا در تمامی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا، خصوصا نواحی که ارتباط نزدیکی بین انسان و سگ وجود دارد، به وفور دیده میشود (1). ایران جزء مناطق آندمیک و در برخی مناطق هیپر آندمیک می باشد. شیوع بالاتر بیماری در امتداد سلسله جبال البرز و زاگرس و بیشتر در زنان دیده می شود.

تفاوت در حساسیت و مقاومت به ابتلا و عود در بیماریهای عفونی از جمله کیست هیداتیک و آلوئولار در حیوانات و انسان دیده شده است که به دلیل تفاوت در فاکتورهای فردی و پاسخهای ایمنی، مبتنی بر تفاوت در ژنهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت های انسان (HLA) و یا حیوان، می باشد (2). ناحیه مربوط به کد کردن این آنتی ژنهای روی بازوی کوتاه کروموزوم شش قرار دارد و شامل 4×10^6 نوکلئوتید می باشد (6p21.1 to p21.3) (6). عملکرد اصلی مولکولهای HLA عرضه آنتی ژن به لmfوسیت های T و شروع پاسخهای ایمنی سلولی است پاتوژن عفونتها به وضوح با فاکتورهای تنظیم کننده ایمنی میزبان و سیستم HLA که پپتیدهای آنتی ژنیک را به لmfوسیت های T عرضه می کنند،

ارتباط دارد (3). مشخص شده است که بیماریهای بسیاری با ژنهای سیستم HLA مرتبط هستند و این ژنها در استعداد ابتلا یا مقاومت نقش مهمی دارند (4).

تاکنون ارتباط بین بروز آنتی ژنهای لوکوسیت انسان و حساسیت یا مقاومت به برخی بیماریهای انگلی از جمله مالاریا، کالآزار، لشمانیوز پوستی، توکسوپلاسموز و شیستوزومیازیس مشخص شده است (2). برخی مطالعات به ارتباط بین بروز این آنتی ژنها و کیست هیداتید آلوئولار و تک حفره ای پرداخته اند (5 و 6 و 13). در هر صورت ابهاماتی در چگونگی ابتلا یا عدم ابتلا برخی افراد با محیط و یا شرایط زندگی مشابه وجود دارد و از آنجاییکه ژنهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت انسانی پلی مورف ترین ژنهایی هستند که در ژنوم تمامی گونه ها وجود دارند و بسته به نژاد افراد در هر منطقه با توجه به ژنهای سیستم HLA آنان، ارتباط بیماریها با آنها متفاوت است ضرورت دارد که مطالعات مربوط در ایران و در ارتباط با بیماریهای مختلف صورت پذیرد. بر این اساس برای مشخص کردن خصوصیات ژنومی افراد مستعد به ابتلا در بیماری کیست هیداتید با بررسی آللهای DQB1 و DRB1 به روش مولکولی PCR-SSP ضمن یافتن فراوانی آنتی ژنهای لوکوسیت انسانی کلاس 2 (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1) به دنبال یافتن تفاوت آنها در افراد بیمار و سالم این مطالعه انجام شد تا در صورتیکه رابطه معنی داری از نظر آماری بین نوع آلل و ابتلا به بیماری برقرار باشد به رابطه زمینه ژنتیکی فرد و ابتلای او به بیماری هیداتید پی ببریم. رابطه شناسایی جمعیت های در معرض خطر بالا و یا مقاوم به این بیماری می تواند در برنامه ریزی های بهداشتی و پیشگیری و استفاده از نتایج برای تولید واکسن در آینده، راهبردی و موثر باشد.

مواد و روشها

نوع مطالعه توصیفی (case-series) و نمونه گیری از بین مبتلایان به کیست هیداتیک که کیست های تشخیص داده و یا جراحی شده داشتند، از مناطق مختلف شهری

(23 MIX) DRB1*, DRB*3, DRB*4, DRB*5 و پرایمرهای اختصاصی *DQB1 (8 MIX) و پرایمرهای اختصاصی هورمون رشد انسان HGH. 2 جفت (430 bp, 430 bp) با ترتیب ژن هورمون رشد انسان بصورت لیوفیلیزه استفاده شد. در هر لوله دو پرایمر وجود داشت یکی پرایمر اختصاصی برای PCR – SSP ژن HLA مورد نظر و یک پرایمر برای کنترل داخلی که سکانس آن بر اساس ژن هورمون رشد انسان HGH بود. در واکنش های منفی HLA این کنترل کاملاً قابل تشخیص بود (کنترل مثبت). برنامه PCR فقط با دو مرحله تکثیر (Amplification) و detection انجام گرفت ترموسایکلر مورد استفاده – eppendorf mastercycler و برنامه استفاده شده بدین شرح بود:

Denaturing	120 ثانیه	96 °C	-1
Annealing	15 ثانیه	96 °C	-2
10 سیکل	60 ثانیه	65 °C	-3
	15 ثانیه	96 °C	
20 سیکل	50 ثانیه	61 °C	-4
	30 ثانیه	72 °C	
	unlimited	4 °C	

پس از الکترو فورز محصولات PCR با منبع تغذیه و تانک الکتروفورز (پایا پژوهش پارس) و ژل آگارز 2 درصد به مدت 60 دقیقه با ولتاژ 80 ولت، نمونه های آمپلیفای شده در میدان الکتریکی بر اساس اندازه جدا شدند و برای رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ژل را به مدت 15-30 دقیقه در محلول رنگ قرار داده و پس از این مدت ژل را خارج و با ترانس لومیناتور و ژل داکيومنت باندها بررسی شد. طول محصولات بین 85-265 bp بود که همگی از کنترل HGH کوچکتر بودند. طول محصولات را با باندهای مارکر 50- 1000 bp که در اولین خانه سمت چپ load شده بود مقایسه کرده و در جدول

وروستایی اراک و حومه در سال 1385، انجام شد. بیماران با توجه به بررسی پرونده های موارد جراحی یا بستری به علت کیست هیداتیک در بیمارستان های ولی عصر و قدس و امام خمینی اراک و گزارشات پاتولوژیک مندرج در پرونده، نوع کیست آنها محرز و به عنوان کیست هیداتیک ثبت شده بود.

همه بیماران با بررسی سابقه خانوادگی وبا شرط بومی بودن انتخاب شدند. گروه سالم نیز از همان منطقه جغرافیایی، با زمینه نژادی مشابه، انتخاب گردید. تعداد نمونه های در دسترس بر اساس پرونده های بیمارستانی، آدرس های قابل دسترسی و بعد از حذف نمونه های فوت شده و مهاجرت کرده و یا نمونه هایی که مایل به همکاری نبودند 56 نفر بود که از همگی آنان نمونه گیری خون انجام شد. پس از تشریح اهداف طرح و اخذ رضایتنامه از هر فرد به میزان 3 cc خون با شرایط استریل و طبق دستورالعمل خونگیری و در لوله سیترا ته در دمای 70- تا زمان آزمایش نگهداری شد.

استخراج DNA

جدا سازی DNA بر اساس لیز سلولی و ته نشینی DNA و شستشو و نمک زدایی به وسیله اتانول با استفاده از محلول استخراج DNA از خون کامل (DNG PLUS – Cinnagen inc.) انجام گرفت. در این مرحله زنجیره های دوتایی DNA از خون کامل انسان جدا شده و نیاز به 30 تا 50 دقیقه زمان داشت. پس از اثبات تخلیص با الکتروفورز در ژل آگارز 0/8 درصد، DNA تخلیص شده تا زمان آزمایش در دمای یخچال نگهداری و پس از تعیین غلظت با اسپکتروفتومتر در صورت نیاز با آب مقطر رقیق می شد. بهترین رقت برای این روش بین 25-100 ng/μl و بهترین نتیجه با 50 نانوگرم DNA برای هر واکنش به دست آمد.

آزمایش نمونه ها با روش مولکولی PCR-SSP¹ انجام گرفت. پرایمر ها طبق استاندارد های IHWG² و بصورت یونیورسال و تجاری توسط شرکت Innotrains آلمان تولید شده و با سفارش تهیه گردید. از پرایمرهای اختصاصی

1- Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer
2- International Histocompatibility Working Group

آلی انجام و پس از آن آزمون همگنی با استفاده از χ^2 و fisher's exact test انجام شد و برای نمونه های معنی دار تحلیل رگرسیون لجستیک انجام و Odds ratio آن محاسبه گردید (14 و 18). کلیه مراحل طبق اصول ایمنی مقرر برای کار در آزمایشگاههای بیولوژی مولکولی انجام گرفت و اخلاق پژوهش با رعایت بیانیه هلسینکی در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه آللهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت انسانی کلاس 2 شامل: DRB1*, DRB*3, DRB*5, DRB*4, DRB*23 (واکنش) و DQB1* (8) (واکنش) با روش PCR-SSP بررسی شدند.

فراوانی آللهای DRB1* : آللهای مشاهده شده پس از تعیین ترکیب آلی شامل آللهای زیر بود:

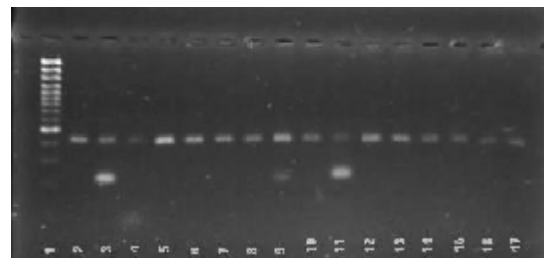
DRB1* 01	DRB1* 03	DRB1* 0308
DRB1* 04	DRB1* 0415	DRB1* 07
DRB1* 08	DRB1* 09	DRB1* 10
DRB1* 11	DRB1* 12	DRB1* 13
DRB1* 1317	DRB1* 14	DRB1* 1410
DRB1* 15	DRB1* 16	

بیشترین فراوانی آللهای DRB1* در بیماران مربوط به آلل 11 DRB1* و کمترین آنها 0308 DRB1* و 12 DRB1* بود.

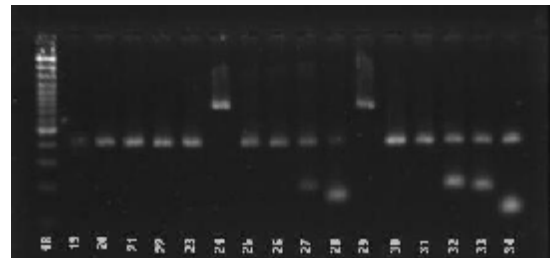
بیشترین فراوانی آللهای DRB1* در افراد سالم مربوط به آلل 04 DRB1* و کمترین آنها 08 DRB1* و 09 DRB1* 1317 و 1410 DRB1* و 09 DRB1* بودند.

آللهای 0308 DRB1* و 1317 DRB1* و 1410 DRB1* و 09 DRB1* فقط در گروه بیماران مشاهده شد و 08 DRB1* فقط در گروه سالم مشاهده شد (نمودار شماره 1).

گزارش نتایج علامت گذاری گردید. گاه در نمونه های یک فرد چندین واکنش مثبت HLA در یک گروه وجود داشت که با استفاده از نرم افزار INNO TRAIN SOFTWARE نتیجه نهایی ترکیب آلی به دست آمد. برای قضاوت نهایی، نتایج سرولوژیک و فراوانی آلل ها در نژادها در نظر گرفته شد. برای مشخص کردن معادل سرولوژیک آللهای مثبت شده در روش مولکولی که در جدول گزارش نتایج ثبت شده بود از جدول تداخل آللهای¹ DR, DQ استفاده شد و معادل سرولوژیک آللهای مثبت شده نیز به دست آمد.



الف



ب

شکل شماره 1 (الف و ب): DNA آمپلیفای شده با 23 پرایمر اختصاصی برای DRB1 (باند های 2-13 و 19-30)، DRB3 (باند 11)، DRB4 (باند 12) و DRB5 (باند 13) و آمپلیفای شده با 8 پرایمر اختصاصی برای DQB1 (باند های 14-17 و 31-34). محصولات اختصاصی آللهای در زیر باندهای کنترل مثبت داخلی (محصول PCR ژن هورمون رشد انسان) در باندهای 3 و 9 و 11 و 27 و 28 و 32 و 33 و 34 مشاهده می شوند. مارکر bp 50-1000 در سمت چپ ژل ها در اولین ستون دیده می شود (1 و 18).

ابزار جمع آوری داده ها در این تحقیق عبارت بودند از پرسشنامه و نتایج قرائت آزمایشات که از 56 نفر بیمار در دسترس به عمل آمد. آنالیز نتایج مولکولی ابتدا با استفاده از نرم افزار INNO TRAIN SOFTWARE برای تعیین ترکیب

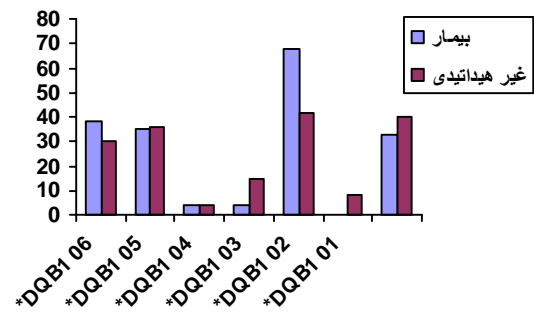
نتایج نشان داد که توزیع آلل 03 DQB1* با (P<0.02) در بیماران هیداتیدی و افراد غیر هیداتیدی یکسان نیست و در دو گروه متفاوت است. با استفاده از تحلیل رگرسیون لجستیک و محاسبه Odds - ratio مشخص گردید که شانس استقرار و رشد کیست های هیداتیک در افراد 03 DQB1* مثبت 2/87 برابر کمتر از افراد 03 DQB1* منفی می باشند (Odds - ratio = 2/87) و (P<0.02) (جدول شماره 1).

جدول شماره 1- توزیع درصد فراوانی و شاخصهای آماری آلل های DQB1 در مبتلایان به کیست هیداتیک و افراد غیر هیداتیدی

آلل ها	فراوانی		Odds-ratio	P
	بیمار	سالم		
DQB1* 02	39/3	26/7	-	N.S
DQB1* 0203	7/1	0	-	N.S
DQB1* 03	41/1	66/7	2/87	< 0. 02
DQB1* 0304	14/3	3/3	-	N.S
DQB1* 04	3/6	3/3	-	N.S
DQB1* 05	35/7	33/3	-	N.S
DQB1* 06	30/4	36/7	-	N.S

بحث

ژنهای آنتی ژنهای لوکوسیت انسانی پلی مورف ترین ژنهایی هستند که در ژنوم تمامی گونه ها وجود دارند. وجود برخی از لوکوسهای خاص HLA فرد را نسبت به تعدادی از بیماریها مقاومتر یا حساستر از افراد دیگر همان گونه می کند. در مورد ارتباط HLA با بیماری نظرات گوناگونی وجود دارد (19). تاکنون ارتباط بین بروز آنتی ژنهای لوکوسیت انسان و حساسیت یا مقاومت به برخی بیماریهای عفونی از جمله سل (20) و مالاریا و جذام و بیماریهای انگلی از جمله کالآزار (21)، لشمانيوز پوستی (22 و 23)، توکسوپلاسموز و شیستوزومیازیس (2 و 24) مشخص شده است برای مثال در آفریقای غربی که مالاریا بصورت آندمیک می باشد آلل HLA- B53 شایعتر است این آلل بطور اختصاصی به پپتیدهای مشتق از انگل مالاریا متصل می شود. تفاوت در



نمودار شماره 1: مقایسه درصد فراوانی آللهای DQB1* در مبتلایان به کیست هیداتیک و افراد غیر هیداتیدی

آنالیز آماری نشان داد که توزیع آللهای DRB1 در بیماران هیداتیدی و افراد سالم علیرغم اختلاف در نمونه ها در دو گروه یکسان است.

با بررسی فراوانی آللهای DRB*3, DRB*4, DRB*5

بیشترین فراوانی آللهای DRB در بیماران مربوط به آلل DRB3 و کمترین آنها DRB5 بود. بیشترین فراوانی آللهای DRB در افراد سالم مربوط به آلل DRB4 و کمترین آنها DRB5 بود.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که توزیع آللهای

DRB در بیماران هیداتیدی و افراد سالم در دو گروه یکسان بوده و توزیع آللهای DRB 3,4,5 در دو گروه یکسان است.

با بررسی فراوانی آللهای DQB1* (8 واکنش) نیز آللهای زیر مشاهده شد:

DQB1* 06, DQB1* 05, DQB1* 04

DQB1* 0304, DQB1* 03, DQB1* 0203, DQB1* 02. بیشترین فراوانی آللهای DQB1* در بیماران مربوط به آلل DQB1* 02 و کمترین آنها DQB1* 04 بود. بیشترین فراوانی آللهای DQB1* در افراد سالم مربوط به آلل DQB1* 03 و کمترین آنها DQB1* 0304 و DQB1* 04 بودند. آلل DQB1* 0203 فقط در گروه بیماران مشاهده شد (جدول شماره 1).

تحقیق توماس ایرمن در سال 1998 که در آن اشکال مختلف DRB1 در 151 بیمار با کیست آلوئولار بررسی شد نشان داد DRB1*11 با کاهش خطر پیشرفت بیماری همراه است و نشان داد که DRB1*11 ممکن است مقاومت در مقابل A.E. ایجاد کند در حالیکه DRB1*02 می تواند نشانگر خطر رشد و پیشرفت بیماری باشد (9). اما در تحقیق حاضر بیشترین فراوانی آللهای DRB1* در بیماران مربوط به آلل 11 DRB1* بود، علیرغم اینکه تفاوت معنی داری با گروه سالم نداشت. DRB1*02 نیز که در تحقیق ایشان با خطر رشد و پیشرفت بیماری کیست آلوئولار همراه بود در تحقیق ما فاقد خصوصیت قابل بحث بود.

لی در سال 2000 مطالعه ای بر روی 34 بیمار با کیست آلوئولار در نواحی با شیوع بالا در غرب چین برای ژنهای DRB1* بوسیله تکنیک PCR-ssp انجام داد و مشخص شد که حساسیت به کیست آلوئولار بطور قوی در ارتباط با آلل DRB1*040x می باشد و شیوع بالای کیست آلوئولار در این ناحیه همراه با فاکتورهای ژنتیکی است. افراد دارای HLA-DRB1*0701 نیز به A.E. مقاوم می باشند (11).

گوتستین در سال 1996 در میان جمعیت کانادایی یوپیکز/اینویپاتز مطالعه ای انجام داد. HLA-DR typing در دو گروه بیماران حساس که هنوز انگل های فعال کبدی داشتند و بیماران مقاوم که بصورت خودبخود خوب شده بودند و ضایعات کلسیفیه و مرده داشتند، انجام شد. گروههای کنترل شامل نزدیکانی می شدند که از نظر ژنتیکی با هم ارتباط داشتند. آنالیز مقایسه ای HLA-DR بین جمعیت آلوده و غیر آلوده تمایل کمی برای مارکرهای حساسیت نسبی به ژنهای HLA-DRB1*0901 و HLA-DRB1*1601,02 نشان داد (13). در مطالعه گودوت در سال 2000 بطور مشخص هاپلوتیپ های HLA-DR3 در بیماران با اشکال حاد بیشتر دیده شده است (7).

حساسیت و مقاومت به ابتلا و عود در بیماریهای عفونی از جمله کیست هیداتیک و آلوئولار در حیوانات و انسان دیده شده است که به دلیل تفاوت در فاکتورهای فردی و پاسخهای ایمنی که مبتنی بر تفاوت در ژنهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت های انسان ویا حیوان می باشد .

برخی مطالعات به ارتباط بین بروز این آنتی ژنها و کیست هیداتیک آلوئولار و تک حفره ای پرداخته اند (3و4و10و25و26).

در مطالعه حاضر تعداد نمونه های در دسترس بر اساس لیست اسامی و آدرس های قابل دسترسی و بعد از حذف نمونه های فوت شده و مهاجرت کرده و یا نمونه هایی که مایل به همکاری نبودند 56 نفر بود که از همگی آنان نمونه گیری خون انجام شد. از 30 نفر سالم برای مقایسه نیز خونگیری شد که سلامت افراد بر اساس عدم وجود علائم بالینی و هر گونه شکایت از علائم احتمالی صورت گرفت.

- ارتباط کیست هیداتیک با آللهای DRB1* : در این مطالعه آللهای DRB1* (23 واکنش) بررسی شدند. بیشترین فراوانی آللهای DRB1* در بیماران مربوط به آلل DRB1* 11 و کمترین آنها DRB1* 0308 و DRB1* 12 بود. بیشترین فراوانی آللهای DRB1* در افراد سالم مربوط به آلل DRB1* 04 و کمترین آنها DRB1* 08 و DRB1* 1317 و DRB1* 1410 و DRB1* 09 و DRB1* 0308 و DRB1* 1317 و DRB1* 1410 و DRB1* 09 فقط در گروه بیماران مشاهده شد و DRB1* 08 فقط در گروه سالم مشاهده شد. آزمون همگنی نشان داد که توزیع آنتی ژنهای DRB1 در بیماران هیداتیدی و افراد سالم علیرغم اختلاف در نمونه ها در دو گروه یکسان است. هیچ مطالعه ای که در آن ارتباط DRB1* با کیست هیداتیک تک حفره ای بررسی شده باشد یافت نشد و امکان مقایسه فراهم نگردید اما در بیماری کیست آلوئولار برخی تحقیقات به این مسئله پرداخته اند.

ایرمن و همکارانش در سال 1996 طی مطالعه خود بر روی 145 بیمار با اکینوкокوزیس آلوئولار، دریافتند که DR3 فراوانی بیشتری در بیماران با بیماری در حال پیشرفت داشت. آنتی ژن HLA DR11 با کاهش خطر ابتلا به کیست آلوئولار در کل بیماران ارتباط داشت و افزایش DR13 در گروه بهبود یافته قابل توجه بود. نتیجه تحقیق آنها نشانگر این بود که آنتی ژنهای DR در ارتباط با حساسیت به اکینوкокوزیس آلوئولار حاد می باشد (8).

گوتستین در مطالعه ای دیگر ارتباط HLA-DR13 را با حساسیت به اکینوкокوزیس آلوئولار در سال 1994 نشان داد (5)

عزب و همکارانش در سال 2004 در 35 بیمار مصری مبتلا به کیست هیداتیک تک حفره ای تاثیر مثبت آنتی ژنهای HLA-DR3, HLA-DR11 را در ایجاد حساسیت به ابتلا به کیست هیداتیک تک حفره ای نشان دادند و ارتباط بین HLA-DR11 را با ایجاد کیست های زیر 5 سانتیمتر بیان کردند (28). آللهای مورد اشاره در بررسی های فوق، در مقایسه با آللهای یافت شده یا معادل سرولوژیک آنها در تحقیق حاضر معنی دار نبوده و متفاوت می باشند. تفاوت نژادی و تفاوت گونه و سویه های انگل با توجه به اینکه نژاد مورد مطالعه و نوع کیست هیداتیک دارای تفاوت با این تحقیق هستند، می تواند بیانگر علت تفاوت در نتایج تحقیقات مختلف با هم و با تحقیق حاضر باشد.

ارتباط کیست هیداتیک با آللهای DQB1* :

در مطالعه حاضر آللهای DQB1* (8 واکنش) بررسی شدند. آللهای مشاهده شده، شامل آللهای زیر بود:

DQB1* 02 و DQB1* 0203 و DQB1* 03 و

DQB1* 0304 و DQB1* 04 و DQB1* 05 و

و DQB1* 06

آزمون همگنی نشان داد که توزیع آللهای DQB1 در بیماران هیداتیدی و افراد غیر هیداتیدی در دو گروه یکسان

نیست و توزیع آلل DQB1* 03 با ($P < 0.02$) در دو گروه متفاوت است. وبا محاسبه Odds – ratio مشخص گردید که شانس استقرار و رشد کیست های هیداتیک در افراد حامل ژن DQB1* 03 برابر کمتر از افرادی است که فاقد ژن DQB1* 03 می باشند. یا به عبارت دیگر این افراد مقاومت بیشتری به ابتلا به کیست هیداتیک در شرایط یکسان دارند.

(Odds – ratio = 2/87) و ($P < 0.02$)

بیشترین فراوانی آللهای DQB1* در بیماران مربوط به آلل DQB1* 02 و کمترین آنها DQB1* 04 بود. بیشترین فراوانی آللهای DQB1* در افراد سالم مربوط به آلل DQB1* 03 و کمترین آنها DQB1* 0304 و DQB1* 04 بود. آلل DQB1* 0203 فقط در گروه بیماران مشاهده شد. هیچ مطالعه ای که در آن ارتباط DQB1 با کیست هیداتیک تک حفره ای بررسی شده باشد یافت نشد و امکان مقایسه فراهم نگردید. سایر مطالعات انجام شده مربوط به کیستهای آلوئولار می باشد.

در تحقیق ایرمن در سال 1998 HLADQB1*02 بیشتر در بیمارانی شایع بود که بیماری پیشرونده کیست آلوئولار داشتند (در مقایسه با بیماران با بیماری در حال کاهش) (9). همراهی HLA- DQB1*02 با کیست آلوئولار در مطالعه ایرمن و بالاتر بودن این آلل در مبتلایان به کیست تک حفره ای در تحقیق حاضر نکته ای قابل توجه و نیازمند مطالعه بیشتر است و می تواند به دلیل تشابهات آنتی ژنیک این دو گونه انگلی از جنس اکینوкокوس باشد.

با یافتن فراوانی آللهای کد کننده آنتی ژنهای لوکوسیت انسانی کلاس 1 و 2 و مقایسه نتایج این گروه با گروه کنترل و مشخص شدن رابطه معنی دار آماری بین آنتی ژن و ابتلا ی به بیماری به رابطه زمینه ژنتیکی فرد و ابتلا ی او به بیماری هیداتید در منطقه مورد بررسی پی بردیم. نتایج این مطالعه نشان دهنده همراهی بین آلل DQB1*03 با مقاومت به این

بیماری بود. نتایج این مطالعه مشخص کرد که شانس استقرار و رشد کیست های هیداتیک در افراد 03 *DQB1 مثبت 2/87 برابر کمتر از افرادی است که 03 *DQB1 منفی می باشند. هم چنین بیشترین فراوانی آلل *HLA DRB1 در بیماران مربوط به آلل 11 *DRB1 و کمترین آنها 0308 *DRB1 و 12 *DRB1 بود. و بیشترین فراوانی آلل های HLA *DRB1 در افراد سالم مربوط به 04 *DRB1 و کمترین آنها 08 *DRB1 و 1317 *DRB1 و 1410 و 09 *DRB1 بود. 0308 *DRB1 و 1410 و 09 *DRB1 فقط در گروه بیماران مشاهده شد و 08 *DRB1 فقط در گروه سالم مشاهده شد که بایستی با مطالعه روی جمعیت های بزرگتر خصوصا روی 11 *DRB1 که در برخی مطالعات (9) ارتباط مثبت یا منفی با کیست های هیداتیک داشته است بررسی شود. نتایج این مطالعه که اولین مطالعه بر روی ارتباط آللهای HLA و کیست هیداتیک در ایران می باشد با برخی تحقیقات انجام شده در سایر نقاط خاورمیانه و کشورهای دیگر تشابهات و اختلافاتی دارد و لازم است در جمعیت های بزرگتر و سایر نقاط ایران هم انجام گردد. بصورت کلی اختلافات بین ارتباط آللهای و آنتی ژنهای HLA CLASS I,II و بیماری کیست هیداتیک در مطالعات مختلف، با توجه به ماهیت مطالعه که مطالعه ای ایمونوزنتیک است و وابسته به خصوصیات ژنتیکی افراد و جمعیت های مورد مطالعه می باشد امری طبیعی و مورد انتظار است و لزوم مطالعات تکمیلی خصوصا با روشهای مولکولی را نشان می دهد.

نتیجه گیری: تفاوت در آللهای HLA که در این تحقیق شناسایی شدند تاییدی بر این فرضیه بود که افراد با توجه به زمینه ژنتیکی خود در ابتلا به کیست هیداتیک حساسیت و یا مقاومت بیشتر دارند و لزوم تحقیقات بیشتر را خصوصا به روشهای مولکولی نشان می دهد. با توجه به اینکه موارد قابل

توجهی از عود کیست و یا بهبودی خودبخود در مبتلایان به کیست هیداتیک دیده می شود و گاه در مواردی که جراحی به علت محل کیست (مثلا در قاعده مغز یا قلب) غیر ممکن یا دارای عوارض زیاد و خطرناک باشد با شناسایی این آلل ها می توان در تصمیم گیری برای ضرورت یا عدم ضرورت جراحی و یا انتخاب نوع درمان کمک گرفت.

شناسایی افراد مستعد به عود بیماری در تصمیم گیری برای درمان دارویی و مدت آن پس از جراحی و پیگیری بیماران اساسی و لازم است. شناسایی جمعیت های در معرض خطر بالا و یا مقاوم به این بیماری می تواند در برنامه ریزی های بهداشتی و پیشگیری و واکسیناسیون راهبردی و موثر باشد.

پیشنهاد می گردد که مطالعات ژنتیکی در افراد سالم مناطق مختلف ایران و گروه های مختلف جمعیتی و نژادی برای تعیین ژنوتیپ آنها صورت پذیرد چرا که با فقدان الگوی ژنومی مردم نمی توان ارتباط دقیق پارامترهای ژنتیکی با بیماریها را بیان کرد.

انجام مطالعات مشابه با تعداد نمونه های بیشتر و هم چنین تکنیکهای دقیق تر در بیماران کیست هیداتیک مناطق دیگر ایران پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

از اساتید محترم و همکاران معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و همکاران دانشکده پزشکی و معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل بیمارستان های ولی عصر، قدس و امام خمینی (تأمین اجتماعی) اراک که مرا در بیمار یابی و خرید مواد و راه اندازی تکنیک، انجام آزمایشات و تجزیه و تحلیل داده های این رساله یاری کردند و همچنین از بیماران عزیز که داوطلبانه و با علاقه زحمت نمونه گیری را متحمل شدند، کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

References

- Nasrieh MA, Abdel-Hafez SK. Echinococcus granulosus in Jordan: assessment of various antigenic preparations for use in the serodiagnosis of surgically confirmed cases using enzyme immuno assays and the indirect haemagglutination test, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2004; 48: 117-123
- Mc Manus DP, Ross AGP, Williams GM, Sleight AC, et al. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic schistosomiasis in a Chinese population, *international journal for parasitology* 2001; 31: 674-680
- Motta P. Association of HLA-DQ and HLA-DR alleles with susceptibility or resistance to HIV-1 Infection among the Population of Chaco Province, Argentina, *MEDICINA (Buenos Aires)* 2002; 62: 245-248
- Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 1999; 401: 921-923
- Gottstein B, Bettens F, Association between HLA-DR13 and susceptibility to alveolar echinococcosis, *J Infect Dis*, 1994; 169 (6): 1416-1417
- Lipsitch M, Bergstrom CT, Antia R. Effect of human leukocyte antigen heterozygosity on infectious disease outcome: The need for allele-specific measures, *BMC Medical Genetics*, 2003; 4: 25-29
- Godot V, Harraga S, Beurton I, Tiberghien P, et al. Resistance/ susceptibility to Echinococcus multilocularis infection and cytokine profile in human. II. Influence of the HLA B8, DR3, DQ2 haplotype, *Clin Exp Immunol*, 2000; 121(3): 491-498
- Thomas Eiermann, Bettens F, Tiberghien P, Bresson-handi S, et al. HLA class II antigens in alveolar echinococcosis, *Human Immunology*, 1996; 47: 124-128
- Eiermann T, Bettens F, Tiberghien P, Schmitz K, et al, HLA and alveolar echinococcosis, *Tissue Antigens*, 1998; 52(2): 124-129
- Shcherbakov, Human echinococcosis: the role of histocompatibility antigens in realizing infestation and the characteristics of their course, *AM- Medical parasitology (MOSK)*, 1993: 8-13
- Li F-Zhonghua Yi Xue ZA Zhi, Shi Y, Shi D, Association of HLA-DRB1 allele and the susceptibility to alveolar echinococcosis in the west of China, *Chung-Hua I Hsueh Tsa Chih (Chinese Medical Journal)*, 2000; 80(6): 414-416
- Ozeretskovskaia NN, Legonkov IA, Shcherbakov AM, Suntsov SN, et al. The level of the eosinophils in the blood, serum immunoglobulin and circulating immune complexes and interferon production in patient with unilocular echinococcosis depending on the location of the cysts, *Med parasitology (MOSK)*, 1993; (2): 4-10
- Gottstein B, Bettens F, Parkinson AJ, Wilson F, Immunological parameters associated with susceptibility or resistance to alveolar hydatid disease in Yupiks/Inupiat, *Arctic Med Res*-01-jan, 1996; 55(1): 9-14
- Svejgaard A, Jersild C, Nielsen LS, Bodmer WF. HLA antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 1974; 4: 95-105

15. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*. Belmont: Duxbury Press, 1999
16. Kangave D. More enlightenment on the essence of applying Fisher's exact test when testing for statistical significance using small sample data presented in a 2 x 2 table. *West Afr J Med* 1992; 11: 179-184
17. William Martin, Hakima Sbai, Anne S. De Groot, *Bioinformatics tools for identifying class I-restricted epitopes*, *Methods*, 2003, 29: 289-298
18. Hongjin Bian, John F. Reidhaar-Olson, Juergen Hammer, *The use bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes*, *Methods*, 2003; 29: 299-309
19. Holden T. Maecker SA, Ghanekar MA. Suni Xiao-song He, et al. Factors Affecting the Efficiency of CD8+ T Cell Cross-Priming with Exogenous Antigens, *The Journal of Immunology*, 2001; 166: 7268-7275
20. Amirzargar AA, Yalda A, hajabolbaghi M, khosravi F, jabbari H, Niknam MH, et al. The association of HLA-DRB, DQA1, DQB1 alleles and haplotypes frequency in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8(8): 1017-1021
21. Meddeb-Garnaoui A, Gritli S, Garbouj S, Ben Fadhel M, et al, Association Analysis of HLA- class II and Class III Gene Polymorphisms in the Susceptibility to Mediterranean Visceral Leishmaniosis, *Human Immunology*, 2001, 62: 509- 517
- 22- مومنی ع، ادیب م، مقدادی م، نیلفروش زاده م ع، اصیلیان ع، باطنی ا و همکاران. بررسی شیوع آنتی ژنهای H.L.A. در بیماران مبتلا به لوپوئید لیشمانیوز. چهارمین کنگره بین المللی ایمونولوژی و آلرژی ایران-اصفهان، خلاصه مقالات- ۱۳۷۷
23. Angelica Olive-Diaz, H, Debaz C, Alaez V. Juarez-Islas, et al. Role of HLA class II Alleles in Susceptibility to and Protection from Localized Cutaneous Leishmaniasis, *Human Immunology*, 2004; 65: 255- 261
24. Eduardo C, Lau j, Sanders S. Genetic Determinants for Resistance/ Susceptibility to Parasitic Infections, *Speciality Laboratories*, 2004; 2: 1-5
25. Torcal M, Navarro-Zorraquino R, Lozano L, et al. Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis, *Clin Exp. Immunol*. 1996; 106: 317-322
26. Tsukasa Sakamoto P, Caberera A. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle, *Acta Tropica*, 2003; 85: 271-279
27. Hernandez A, O'Connor JE, Mir A. Phenotypic analysis of peripheral lymphocyte subpopulation in hydatid patient, *Parasitol Res*, 1999; 85(11): 948-450
28. Azab ME, Bishara SA, Ramzy RM, Oteifa NM, El-Hoseiny LM, Ahmed MA. The evaluation of HLA-DRB1 antigens as susceptibility markers for unilocular cystic echinococcosis in Egyptian patients. *Parasitol Res*. 2004; 92(6):473-477