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

مهدی مسیبی[1]، عبدالحسین دلیمی اصل[2]، سید محمد موذنی[3]، قاسم مسیبی[4]

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

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

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

4- استادیار، گروه ایمونولوژی، 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

Ø مقدمه: هیداتیدوز یکی از بیماریهای انگلی مهم است که با استقرار مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس گرانولوزوس سگ در میزبانان علفخوار واسط مثل گوسفندوگاوو...و هم چنین انسان، ایجاد می شود. تفاوت در حساسیت و مقاومت به ابتلا و عود در بیماریهای عفونی ازجمله کیست هیداتیک و آلوئولار در حیوانات وانسان دیده شده است که به دلیل تفاوت درفاکتورهای 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.

Ø مواد و روشها: برای شناسایی آللهای **DQB1** (23 واکنش)، **DRB1** (8 واکنش) با استفاده از ژنوم انسانی، 56 بیمارایرانی 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 وآللهای شناسایی شده, ثبت شد. آنالیز نتایج مولکولی ابتدا بااستفاده از نرم افزار **INNO TRAIN** و جداول فراوانی و تفسیر آللها برای تعیین ترکیب آللی(**Allele Combination**) انجام و پس از آن آزمون همگنی با استفاده از$\chi 2$ و تست دقیق فیشرانجام شد. برای نمونه های معنی دار تحلیل رگرسیون لجستیک انجام و **Odds - ratio** آنها محاسبه گردید.

Ø یافته ها: نتایج نشان داد که از بین ژنهای بررسی شده**DRB1، DQB1** دربیماران 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).ومصونیت این افراد در صورت مواجهه با عامل بیماری در مقایسه با افراد فاقد این آلل حدود 2/87 برابر می باشد ودارندگان این آلل مقاومت بیشتری در برابر استقرار و رشد کیست هیداتیک تک حفره ای دارند.

Ø 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، **DQB1، DRB1** , 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 می‌شود. درروده، جنین (انکوسفر) ازتخم خارج شده و از طریق خون به بافت‌های مختلف رفته و در آنجا به فرم لاروی کرم که به صورت کیست است در می‌آید. معمولا آلودگی دامها به کیست هیداتیک منجر به کاهش قابل ملاحظه ای درمحصولات دامی (گوشت،شیروپشم و...) می شود.اهمیت بهداشتی هیداتیدوز در انسان به علت هزینه های بیمارستانی، تشخیصی، جراحی، ازکارافتادگی، ناتوانیهای جسمی و حتی مرگ می باشد. بیماری تقریبا در تمامی‌نواحی 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 وانسان 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) ویا حیوان، می باشد (2). ناحیه مربوط به کد کردن این آنتی ژنها 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 لمفوسیتهای T و شروع پاسخهای ایمنی سلولی است پاتوژنز عفونتها به وضوح با فاکتورهای تنظیم کننده ایمنی میزبان و سیستم HLA که پپتیدهای آنتی ژنیک را به لنفوسیت هایT 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، کالاآزار، 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(5و6و...و13). در هر صورت ابهاماتی در چگونگی ابتلا یا عدم ابتلا برخی افراد با محیط و یا شرایط زندگی مشابه وجود دارد واز 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 وDRB1 به روش مولکولی PCR-SSPضمن یافتن فراوانی آنتی ژنها ی لوکوسیت انسانی کلاس2 (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 درمعرض خطر بالا و یا مقاوم به این بیماری می تواند در برنامه ریزی های بهداشتی وپیشگیری واستفاده 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

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. کروه 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 نفربود 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 ودرلوله سیتراته در دمای 70- تا زمان آزمایش نگهداری شد.

استخراج DNA

جدا سازی DNA بر اساس لیز سلولی و ته نشینی DNA وشستشو 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 الکتروفورزیس در ژل اگارز 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 وبهترین نتیجه با 50 نانوگرم DNA برای هر واکنش به دست آمد.

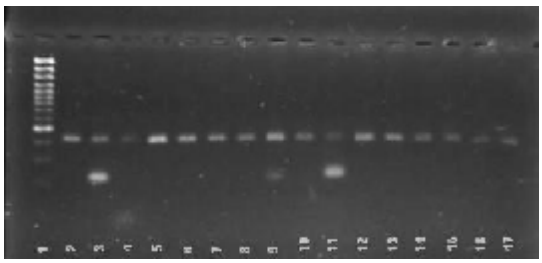
آزمایش نمونه ها با روش مولکولی[1] PCR-SSP انجام گرفت. پرایمر ها طبق استاندارد های IHWG[2] و بصورت یونیورسال و تجاری توسط شرکت Innotrain آلمان تولید شده و با سفارش تهیه گردید. از پرایمرهای اختصاصی (23 MIX) DRB1*, DRB*3, DRB*4,DRB*5 وپرایمرهای اختصاصی DQB1* (8 MIX) وپرایمرهای اختصاصی هورمون رشد انسانHGH، 2جفت (430 bp, 800 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 کاملا قابل تشخیص بود(کنترل مثبت).برنامه PCR فقط با دو مرحله تکثیر(Amlification) و detection انجام گرفت ترموسایکلرمورداستفاده – eppendorf mastercycler وبرنامه استفاده شده بدین شرح بود:

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

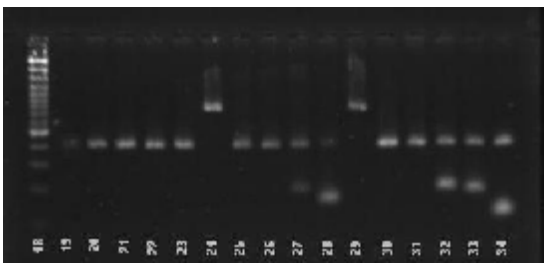
پس از الکترو فورز محصولات PCR با منبع تغذیه و تانک الکتروفورز (پایا پژوهش پارس) وژل آگارز 2 درصد به مدت 60 دقیقه با ولتاژ80 ولت، نمونه های آمپلیفای شده در میدان الکتریکی بر اساس اندازه جدا شدند و برای رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ژل را به مدت 15-30 دقیقه در محلول رنگ قرار داده و پس از این مدت ژل را خارج و با ترانس لومیناتور و ژل داکیومنت باندها بررسی شد. طول محصولات بین bp 85-265 بود که همگی از کنترل HGH کوچکتر بودند. طول محصولات را با باندهای مارکر bp 1000 -50 که در اولین خانه سمت چپ load شده بود مقایسه کرده و در جدول

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

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 افزارINNO TRAIN SOFTWARE نتیجه نهایی ترکیب آللی 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 آللهای[1] 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 (باندهای 13-2 و 30-19)، DRB3 (باند 11)، DRB4 (باند12) و DRB5 (باند13) و آمپلیفای شده با 8 پرایمراختصاصی برایDQB1 (باندهای 17-14 و 34-31). محصولات اختصاصی آللها در زیر باندهای کنترل مثبت داخلی(محصولPCR ژن هورمون رشد انسان) در باندهای 3 و 9 و11 و 27 و28 و32 و33 و 34 مشاهده می شوند. مارکر bp 1000-50 در سمت چپ ژل ها در اولین ستون دیده می شود(الف و18).

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 بااستفاده از نرم افزار INNO TRAIN SOFTWARE برای تعیین ترکیب آللی انجام و پس از آن آزمون همگنی با استفاده از$\chi 2$ و fisher's exact test انجام شد و برای نمونه های معنی دار تحلیل رگرسیون لجستیک انجام و Odds ratio آن محاسبه گردید (14و... و18). کلیه مراحل طبق اصول ایمنی مقرر برای کار در آزمایشگاههای بیولوژی مولکولی انجام گرفت واخلاق 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*4,DRB*5 (23 واکنش) و DQB1* (8 واکنش) با روش PCR-SSP بررسی شدند.

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

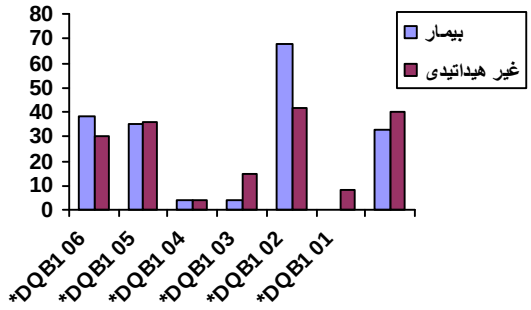
DRB1* 01	DRB1* 03	DRB1* 0308
DRB1* 04	DRB1* 0415	DRB1* 07
DRB1* 08	DRB1* 09	DRB1* 10
DRB1* 11	DRB1* 12	DRB1* 13
DRB1* 1317	DRB1* 14	DRB1* 1410
DRB1* 15	DRB1* 16	

بیشترین فراوانی آللهای*DRB1 در بیماران مربوط به آلل 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 بودند.

آللهای 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 (نمودار شماره 1).

1. Interpretation Chart



نمودار شماره 1: مقایسه درصد فراوانی آللهای *DQB1 در مبتلایان به کیست هیداتیک و افرادغیر 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 آللهایDRB در بیماران مربوط به آلل DRB3و کمترین آنها DRB5 بود. بیشترین فراوانی آللهایDRB در افراد سالم مربوط به آلل DRB4 و کمترین آنها DRB5 بود.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که توزیع آللهای DRB در بیمارن 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).

نتایج نشان داد که توزیع آلل DQB1* 03 با (P<0.02) در بیماران هیداتیدی و افراد غیر هیداتیدی یکسان نیست و در دوگروه متفاوت است. با استفاده از تحلیل رگرسیون لجستیک و محاسبه Odds – ratio مشخص گردید که شانس استقرار و رشد کیست های هیداتیک در افراد DQB1* 03مثبت 2/87 برابر کمتر از افراد ی است که DQB1* 03 منفی می باشند(Odds – ratio = 2/87) و (P<0.02)(جدول شماره1).

جدول شماره 1- توزیع درصد فراوانی و شاخصهای آماری آلل های DQB1در مبتلایان به کیست هیداتیک و افراد غیر هیداتیدی

آلل ها	فراوانی بیمار	فراوانی سالم	Odds-ratio	P
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 بیماریها ی عفونی از جمله سل(20) ومالاریا و جذام وبیماریهای انگلی از جمله کالاآزار(21)، لشمانیوز پوستی(22و23)، توکسوپلاسموزو شیستوزومیازیس(2و24) 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

حساسیت و مقاومت به ابتلا و عود در بیماریهای عفونی از جمله کیست هیداتیک و آلوئولار در حیوانات وانسان 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 هیداتید آلوئولار و تک حفره ای پرداخته اند(3و4و...10و25و26).

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 نفربود 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 علایم بالینی و هر گونه شکایت از علایم 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 بود. آللهای0308 *DRB1 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 ژنهایDRB1 در بیمارن 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.

. تحقیق توماس ایرمن در سال1998 که در آن اشکال مختلفDRB1 در 151 بیمار با کیست آلوئولار بررسی شد نشان دادDRB1*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 DRB1* 11 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 2000مطالعه 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 میباشد وشیوع بالای کیست آلوئولار در این ناحیه همراه با فاکتورهای ژنتیکی است. افراد دارایHLA-DRB1*0701 نیز به .A.E مقاوم می باشند(11).

گوتستین در سال 1996در میان جمعیت کانادایی یوپیکز/اینوپیاتز 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).

ایرمن و همکارانش در سال 1996طی مطالعه خود بر روی 145 بیمار با اکینوکوکوزیس 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 اکینوکوکوزیس آلوئولار حاد می باشد(8).

گوتستین درمطالعه ای دیگر ارتباط HLA-DR13 را با حساسیت به اکینوکوکوزیس 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، درمقایسه 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 وDQB1* 0203 وDQB1* 03 و DQB1* 0304 وDQB1* 04 و DQB1* 05 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 2/87 برابر کمتر از افراد ی 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 DQB1*02 -HLA با کیست آلوئولاردر مطالعه ایرمن وبالاتر 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 اکینوکوکوس باشد.

با یافتن فراوانی آللهای کد کننده آنتی ژنها ی لوکوسیت انسانی کلاس 1 و 2 و مقایسه نتایج این گروه با کروه کنترل و مشخص شدن رابطه معنی دار آماری بین آنتی ژن و ابتلا ی به بیماری به رابطه زمینه ژنتیکی فرد و ابتلای 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 DQB1* 03 مثبت 2/87 برابر کمتر از افراد ی است که DQB1* 03 منفی می باشند. هم چنین بیشترین فراوانی آلل HLA DRB1* در بیماران مربوط به آلل DRB1* 11 و کمترین آنها DRB1* 0308 و DRB1* 12 بود. و بیشترین فراوانی آلل های HLA DRB1* در افراد سالم مربوط به DRB1* 04 و کمترین آنها DRB1* 08 و DRB1*1317 و DRB1* 1410 و DRB1* 09 بود. DRB1* 0308 و DRB1*1317و DRB1* 1410 و DRB1* 09 فقط در گروه بیماران مشاهده شد و DRB1* 08 فقط در گروه سالم مشاهده شد که بایستی با مطالعه روی جمعیتهای بزرگتر خصوصا روی DRB1* 11 که در برخی مطالعات(9) ارتباط مثبت یا منفی با کیستهای 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 آللها و آنتی ژنهای HLA CLASS I,II و بیماری کیست هیداتیک در مطالعات مختلف، با توجه به ماهیت مطالعه که مطالعه ای ایمونوژنتیک 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 شودو گاه در مواردی که جراحی به علت محل کیست(مثلا در قاعده مغز یا قلب) غیر ممکن یا دارای عوارض زیاد وخطرناک باشد با شناسایی این آلل ها می توان در تصمیم گیری برای ضرورت یا عدم ضرورت جراحی ویاانتخاب 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 درمعرض خطر بالا و یا مقاوم به این بیماری می تواند در برنامه ریزی های بهداشتی وپیشگیری و واکسیناسیون راهبردی و موثر باشد.

پیشنهاد می گردد که مطالعات ژنتیکی در افراد سالم مناطق مختلف ایران و گروههای مختلف جمعیتی و نژادی برا ی 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 وهمکاران 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 (تامین اجتماعی) اراک که مرا دربیمار یابی و خرید مواد و راه اندازی تکنیک، انجام آزمایشات و تجزیه و تحلیل داده های این رساله یاری کردند و همچنین از بیماران عزیزکه داوطلبانه و با علاقه زحمت نمونه گیری را متحمل شدند، کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

References

1. 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
2. Mc Manus DP, Ross AGP, Williams GM, Sleigh AC, et al. HLA class II antigens positively and negatively associated with hepatosplenic shcistosomiasis in a Chinese population, international journal for parasitology 2001; 31: 674-680
3. 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
4. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. Nature 1999; 401: 921-923
5. Gottestein B, Bettens F, Association between HLA-DR13 and susceptibility to alveolar echinococcosis, J Infect Dis, 1994; 169 (6): 1416-1417
6. 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
7. 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
8. Thomas Eiermann, Bettens F, Tiberghien P, Bresson-handi S, et al. HLA class II antigens in alveolar echinococcosis, Human Immunology, 1996; 47: 124-128
9. Eiermann T, Bettens F, Tiberghien P, Schmitz K, et al, HLA and alveolar echinococcosis, Tissue Antigens, 1998; 52(2): 124-129
10. Shcherbakov, Human echinococcusis: the role of histocompatibility antigens in realizing infestation and the characteristics of their course, AM– Medical parasitol (MOSK), 1993: 8-13
11. 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
12. 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 echinococcusis depending on the location of the cysts, Med parasitol (MOSK),1993; (2): 4-10
13. Gottestein B, Bettens F, Parkinson AJ, Wilson F, Immunological parameters associated with susceptibility or resistance to alveolar hydatid disease in Yupiks/Inupiats, Arctic Med Res-01-jan, 1996; 55(1): 9-14
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
۲۲- 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 Cutaneus 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. Hernandes 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