● مقاله تحقیقی

بررسی ارتباط بین HLA (کلاس‌های I, II) با پیشرفت بیماری در بیماران HIV/AIDS مراجعه کننده به مرکز مشاوره بیماری‌های رفتاری بیمارستان امام خمینی تهران درسال‌های ۸۹-۱۳۸۸

دکتر مینو محرز[۱]، دکترعلی اکبر امیر زرگر[۲]، دکتر حسین جباری[۳]، *دکتر حسن حیدرنیا[۴]، دکتر بنفشه مرادمند بدیع[۵]، دکتر مهرناز رسولی نژاد[۱]

چکیده

مقدمه: HLA کلاس I و II نقش عمده‌ای در پاسخ ایمنی میزبان نسبت به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) دارد بطوری که به عنوان یک عامل مهم در پیشرفت به سمت بیماری ایدز شناخته می‌شود. هدف مطالعه بررسی ارتباط انواع آلل‌های HLA مستعد کننده و پیشگیری کننده با سیر بیماری در افراد HIV مثبت در مقایسه با افراد سالم می‌باشد.

روش بررسی: این بررسی بصورت مورد- شاهدی انجام شد، که HLA از ۴۸ بیمار مراجعه کننده به مرکز مشاوره بیماری‌های رفتاری بیمارستان امام خمینی در سال‌های ۸۹-۸۸ با HLA گروه کنترل (افراد سالم که در گروه ایمیونوژنتیک دانشگاه تهران تهیه شده بود)، مقایسه شد. جمع‌آوری اطلاعات توسط فرم اطلاعاتی پرونده بیمار برای هر مورد تکمیل شد. نمونه خون گرفته شده از بیماران به گروه ایمیونوژنتیک فرستاده شد و DNA بیماران استخراج و HLA-Typing بیماران توسط دستگاه PCR-SSP و کیت‌های استاندارد HLA انجام گردید.

یافته‌ها: در مجموع تعداد ۴۸ نفر بیمار HIV مثبت از نظر شاخص ژنتیکی HLA بررسی شد و با ۱۰۰ نفر از افراد سالم در گروه کنترل مقایسه شد که آلل‌های مستعد کننده در افراد HIV مثبت بصورت زیر بود:

HLA- DRB1* 0301 (1.32< OR< 7.09, P= 0.0037)
HLA- DQA1 * 0501(1.01< OR< 4.97, P= 0.03)
HLA- DQB1 * 0201 (0.98< OR< 3.50, P= 0.04)

و آلل پیشگیری کننده نیز در این افراد HLA-DRB1*1301 (0.01< OR< 0.98, P= 0.022) بود. همچنین آلل‌های HLA-B*5701 و HLA-B*2701 کمترین فراوانی را در افراد HIV مثبت داشته که از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری: در این بررسی با توجه به حجم کم بیماران نیاز به مطالعات بیشتر و تعداد نمونه بیشتر می‌باشد که با شناخت ساختار HLA بیماران و پیدا کردن آلل‌های مستعد کننده می‌توان در تصمیم‌گیری شروع زودتر درمان این بیماران استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ویروس نقص ایمنی انسانی، آنتی‌ژن لکوسیت انسانی، پیشرفت بیماری

۱. استاد بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. استاد گروه ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استادیار بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، اداره بهداشت و درمان نهاجا(*مؤلف مسؤول)
۵. پزشک عمومی و پژوهشگر مرکز تحقیقات ایدز

مجله علمی ابن سینا / اداره بهداشت و درمان نهاجا (سال چهاردهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۰، مسلسل ۴۱)
تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

مقدمه

اکثر مطالعات انجام شده در ارتباط با عفونت HIV بر پایه عوامل غیر ژنتیکی بوده و در زمینه عوامل ژنتیکی تحقیقات کمتری صورت گرفته است. یکی از مهمترین مواردی که در افراد مبتلا به HIV نیاز به بررسی و مطالعات بیشتری دارد این است که چرا برخی از این افراد بعداز ابتلا سیری پیشرونده و سریع به سمت بیماری AIDS طی می‌کنند و در برخی دیگر سیری آهسته به سمت بروز علائم بالینی و ورود به مرحله AIDS دارند. از جمله عللی که مطرح می‌شود، فاکتور پاسخ ایمنی میزبان و فاکتورهای ویرولوژیک و مهمتر از همه فاکتور ژنتیکی میزبان می‌باشد که مهمترین فاکتور ژنتیکی میزبان پروفایل HLA می‌باشد. HLA نماد پاسخ ایمنی است که استعداد ژنتیکی فرد در ابتلا و پیشرفت بیماری را نشان می‌دهد. نوع HLA موجود در یک فرد یا نژاد، فرد مبتلا را نسبت به پیشرفت بیماری مستعدتر یا مقاوم‌تر می‌سازد [۱].

با توجه به سلول‌های HLA و توزیع آن براساس محدوده جغرافیایی و ژنتیک لازم است بررسی‌های بیشتری در هر کشور و نژاد صورت گیرد که آلل‌های محافظ و آلل‌های مستعد کننده در هر نژاد بررسی شوند و بدین گونه با پی بردن به انواع آلل‌های HLA در افراد HIV مثبت و مقایسه با افراد نرمال در یک نژاد می‌توان افراد واجد HLA مستعد کننده را شناسایی کرد و اقدامات پیشگیری دارویی یا درمانی را زودتر آغاز نمود و بر بقای بیماران مبتلا به HIV/AIDS افزود [۵-۲].

از آنجایی که عفونت با ویروس HIV و پیشرفت آن به سمت بیماری ایدز مربوط به هر دو عامل میزبان و ویروس می‌باشد، لذا در مطالعات انجام شده روی این بیماری هر دو عامل باید تحت ارزیابی قرار بگیرند. در میزبان چندین مکانیسم مختلف در جهت عدم توانایی cell Mediated Immunity شرح داده شده است که از جمله آنها کاهش تنظیم MHC است که باعث کاهش در تشخیص سلول‌های آلوده به HIV می‌شود که باعث پیشرفت ایدز شده یا ممکن است باعث عدم پیشرفت به مدت طولانی(long-term non progressors) شود که در این صورت پیشرفت آهسته پروفایل HLA یک عامل مهم آن می‌باشد و در این زمینه مولکول‌های B*57 نقش یک محدود کننده رپلیکاسیون ویروس را در افراد دارای آلل‌های HLA-B*5701 و HLA-B*27 بازی می‌کند، که درکل در مقایسه با بیمارانی که HIV در آنها پیشرفت می کند دارای بار ویروسی کمتر و پاسخ سلولی و هومورال قوی‌تری هستند (افراد دارای HLA-B*5701 پاسخ‌های اختصاصی نسبت به آنتی‌ژن‌های tat و rev ویروس HIV را محدود می‌کند) [۱]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ در ایالات متحده انجام شد که آلل‌های HLA زیر با کاهش سریع CD4 و یا افزایش لود ویروسی همراهی داشتند:

HLA-A*56/ HLAB*37/ HLA-A*24 و در مقابل آلل‌های HLA-B*57, DRB1*01 با عدم کاهش سریع CD4 و یا کاهش لود ویروسی همراهی داشتند که HLA-B*57 با قوی‌ترین عامل در کاهش لود ویروسی گزارش شد [۶].

در سال ۲۰۰۷ نیز طی مطالعه‌ای که توسط آکادمی آمستردام هلند انجام شد، HLA-B*35 به عنوان یک آللProgressor معرفی شد، HLA-B*57 نیز به عنوان یک آلل محافظت کننده قوی معرفی شد [۷].

همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸ در هند، HLA-A*02 به عنوان یک آلل محافظت کننده و HLA-B*27 به عنوان یک آلل به تأخیر اندازنده ایدز معرفی شد و HLA-A*24 و HLA- B*35 و HLA-DRB1*03 به عنوان عوامل Rapid Progressor معرفی شدند [۸].

روش بررسی

در این مطالعه پس از اخذ رضایت نامه از تعداد ۴۸ بیمار واجد شرایط که HCV منفی بودند، اطلاعات شخصی گرفته شد و جهت بررسی سوابق آنها و آزمایشات انجام شده، از

پرونده بیماران واقع در مرکز بیماری‌های رفتاری بیمارستان امام خمینی(ره) استفاده شد و در طول انجام طرح نیز آزمایشات جدید به آن اضافه شد. بعد از پر کردن فرم پرسشنامه ۱۰ cc خون از بیمار در دو لوله جداگانه سرپوش‌دار که محتوی EDTA بود، ریخته شد و بعد از اطمینان از عدم انعقاد در دمای ۸۰- °C نگهداری شده و بعد از تکمیل کل نمونه‌ها به بخش ایمونوژنتیک دانشگاه تهران منتقل و مشخصات تک‌تک نمونه‌ها ثبت شد. و استخراج DNA و آزمایشات مربوط به آللهای مختلف به روش PCR-SSP (PCR-sequence specific primers) انجام شدکه به صورت زیر می‌باشد:

DNA با استفاده از روش salting out استخراج گردید. نمونه DNA استخراج شده در چاهک‌ها با (MM) Master Mix و Primerها که ازکیت‌های استاندارد تهیه شد، مخلوط شدند و به آنها آنزیم پلیمراز اضافه و به سطح آنها جهت جلوگیری از تبخیر روغن اضافه شد. محلول حاصل در ترموسیکلر (Thermocycler) قرار گرفت. ترموسیکلر برای ۱۰ دور افزایش و کاهش سیکلیک (°C ۹۴ به مدت ۱۰ ثانیه و °C ۶۵ به مدت ۶۰ ثانیه) و سپس ۲۰ دور دیگر افزایش و کاهش دما در درجات متفاوت (°C ۹۴ به مدت ۱۰ ثانیه، °C ۶۴ به مدت ۵۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه) تنظیم گردید. سپس نمونه‌ها از ترموسیکلر خارج گردید و در هر چاهک تعبیه شده بر روی ژل آگارز به میزان ۸ لاندا از نمونه‌ها مورد نظر قرار داده شد. سپس در شانک الکتروفورز با استفاده از بافر 1 X- TAE به مدت ۱۶ دقیقه و با ولتاژ ۱۴۰ ولت، الکتروفوز انجام شد سپس ژل جهت رنگ‌آمیزی به درون محلول ایتدیم بروماید به مدت ۳- ۲ دقیقه منتقل گردید و پس از شسته شدن توسط محلول آب مقطر باندهای تشکیل شده از آلل‌های مختلف HLA به همراه اینترنال کنترل‌های مربوطه با استفاده از U.V ترنس ایلومیناتور خوانده شد. تفسیر نتایج براساس وجود و یا عدم وجود باندهای اختصاصی جهت آلل‌های مختلف صورت گرفت.

اطلاعات دموگرافیک و آزمایشات و HLA بیماران نیز توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد و HLA بیماران با گروه کنترل مقایسه و نسبت شانس (OR)، فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) و مقدار P محاسبه شد.

یافته‌ها

از ۴۸ بیمار مورد مطالعه، ۴۱ بیمار زن و ۷ بیمار مرد بودند که البته قابل ذکر است که جنس در پروفایل HLA تأثیرگذار نیست، سن افراد بین ۲۴ تا ۵۸ سال بود که متوسط سن آنها ۳۶ سال بود و ۳۴ نفر از بیماران متأهل بوند و همسر ۹ نفر از آنها فوت شده بود (به علت HIV) و ۳ نفر مطلقه و ۲ نفر مجرد بودند.

از نظر نژاد همه بیماران مورد مطالعه ملیت ایرانی داشتند. سال‌های ازدواج، تعداد و سن فرزند افراد HIV مثبت نیز با توجه به اینکه آزمایش Western Blot زمان واقعی مبتلا شدن را نشان نمی‌دهد و اینکه اکثر بیماران زن بودند و ریسک فاکتور آنها همسر آلوده به HIV بود، در این مطالعه لحاظ شد تا زمان تقریبی ابتلا به دست آید. در اطلاعات آزمایشگاهی بدست آمدن مدت مثبت شدن آزمایش Western Blot از ۲ سال تا ۱۴ سال بود که متوسط ۵/۵ سال بود. میانگین شمارش اولین CD4 آنها ۴۶۷/۷و میانگین شمارش آخرین CD4 آنها ۲۹۱/۲ بود. نتایج بدست آمده از فراوانی آلل‌های HLA در گروه HIV مثبت و مقایسه با گروه کنترل بصورت زیر بود:

در کل بیشترین درصد فراوانی آلل‌های مختلف در افراد HIV مثبت شامل موارد زیر بود:

HLA-A*0201 (۲۲٪)، HLA-B*3501(۱۷٪)، HLA-DRB1*0301 (۱۹٪)، HLA-DQA1*0505 (۱۹٪)، HLA-DRB1*1101 (۱۹٪)، HLA-DQB1 *0201 (۳۰٪)، HLA-DQA1*0501 (۱۹٪) و کمترین درصد فراوانی آلل‌های مختلف در این گروه را آلل‌های HLA-A*3101، HLA-B*2701، HLA-B*5701، HLA-DRB1*1001، HLA-DQA1*0601، HLA-DQB1

0401 * شامل می‌شد که هر کدام ۱/۰۴٪ بود.

جدول ۱ نتایج حاصل از مقایسه دو گروه را نشان می‌دهد.

آلل HLA- DRB1*0301، شانس ابتلا به عفونت را ۳/۱۳ باردر افراد بیمار افزایش می‌دهد.

HLA-DRB1*0301
(OR=۳/۱۳, CI:۱/۳۲-۷, P=۰/۰۰۳۷)

آلل HLA- DQB1*0201 شانس ابتلا به عفونت را در افراد بیمار ۱/۸۵ بار افزایش می‌دهد.

HLA-DQB1*0201
(OR=۱/۸۵, CI:۰/۹۸-۳/۵۰, P=۰/۰۴)

آلل HLA- DQA1*0501، شانس ابتلا به عفونت را در افراد بیمار ۲/۲۳ بار افزایش می‌دهد.

HLA-DQA1*0501
(OR=۲/۲۳, CI:۱/۰۱-۴/۹۷, P=۰/۰۳)

آلل HLA-B*1302 شانس ابتلا به عفونت را ۷/۴۳ بار افزایش می‌دهد.

HLA-B*1302
(OR=۷/۴۳, CI:۰/۷۷-۱۷۷/۲۷, P=۰/۰۳۷)

آلل HLA- DRB1*1301 شانس ابتلا به عفونت را ۰/۱۳ بار کاهش می‌دهد.

HLA-DRB1*1301
(OR=۰/۱۳, CI:۰/۰۱-۰/۰۸, P=۰/۰۰۲)

بحث و نتیجه‌گیری

اطلاعات دموگرافیک نظیر سن و جنس و وضعیت تأهل تنها به عنوان اطلاعات زمینه‌ای جهت شناسایی افراد شرکت کننده در این مطالعه ارائه شد و در نتیجه‌ی مطالعه تأثیرگذار نیست.

از سال‌های ازدواج و فرزند HIV مثبت و ریسک فاکتورها جهت مشخص شدن زمان تقریبی ابتلا به HIV استفاده شد.

مقایسه نتایج بدست آمده در این مطالعه با مطالعات قبل در ارتباط با آلل‌های HLA در کل افراد HIV مثبت و گروه کنترل بصورت زیر می‌باشد:

جدول۱- مقایسه آلل‌های HLA بررسی شده در دو گروه مورد و شاهد

	نسبت‌شانس	فاصله‌اطمینان	مقدارP
آلل‌های مستعد کننده			
HLA-B*3501	۱/۱۲	۰/۵۴-۲/۳۳	۰/۷۳۳
HLA-A*2402	۱/۰۵	۰/۴۹-۲/۲۰	۰/۸۹۲
HLA-DRB1*0301	۳/۱۳	۱/۳۲-۷/۰۰	۰/۰۰۳
HLA-B*1302	۷/۴۳	۰/۷۷-۱۷۷/۲۷	۰/۰۳۷
HLA-DQB1*0201	۱/۸۵	۰/۹۸-۳/۵۰	۰/۰۴
HLA-DQA1*0501	۲/۲۳	۱/۰۱-۴/۹۷	۰/۰۳
آلل‌های پیشگیری کننده			
HLA-B*2701	۰/۲۹	۰/۰۱-۲/۴۹	۰/۲۲۳
HLA-B*5701	۰/۲۹	۰/۰۱-۲/۴۹	۰/۲۲۳
HLA-DRB1*1301	۰/۱۳	۰/۰۱-۰/۰۸	۰/۰۲

همانطور که در یافته‌ها بیان شد آلل HLA- A در افراد بیمار نسبت به افراد سالم تفاوت معنی‌دار در هیچ آللی نداشت، اما در مطالعه‌ای که توسط Paras و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد [۸] آلل HLA- A*24 به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی شد و همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ انجام شد آلل‌های HLA- A*24 و HLA- A*56 به عنوان آلل‌های مستعدکننده شناخته شدند [۶] که در این مطالعه با توجه به اینکه رابطه معنی‌دار بدست نیامد. اما آلل HLA- A*24 با فراوانی نزدیک به ۱۴٪ دومین آلل از نظر فروانی بود که در محاسبات با توجه به عدد OR می‌توان آن را یک عامل مستعدکننده معرفی کرد، البته با افزایش حجم نمونه P معنی‌دار و فاصله اطمینان قابل تعمیم به جامعه امکان‌پذیر است.

در مورد آلل HLA- B نیز مطالعات متعدد انجام شده است که از جمله توسط Nelson و همکاران در سال ۱۹۹۹ [۳] و همچنین Elizabeth A و همکاران در سال ۲۰۰۱ [۵] که هر دو در ایالات متحده بود، آلل HLA- B*35 به عنوان یک آلل مستعدکننده و آلل‌های HLA- B*27 و HLA- B*57 نیز به عنوان آلل‌های محافظت کننده معرفی شدند که در این مطالعه نیز HLA-B*35 بیشترین فراوانی را در این

گروه HLA داشت اما رابطه معنی‌دار بدست نیامد. اما از روی عدد OR می‌توان آنرا به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی کرد که با افزایش تعداد نمونه P معنی‌دار و فاصله اطمینان قابل تعمیم به جامعه امکان‌پذیر است.

آلل‌های HLA- B*27 و HLA- B*57 نیز در کل گروه HIV مثبت هر کدام متعلق به یک نفر بود که در مقایسه با گروه کنترل نتیجه مثل هم بدست آمد و P معنی‌دار نبود که در اینجا عدد OR کوچکتر از بقیه بود که می‌توان آنرا به عنوان آلل‌های محافظت کننده معرفی کرد که با افزایش حجم نمونه و معنی‌دار شدن P و فاصله اطمینان قابل تعمیم به جامعه نیز امکان‌پذیر خواهد بود.

در این گروه از آلل‌ها، آلل HLA- B * 1302 با P معنی‌دار به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی می‌شود. البته فاصله اطمینان قابل تعمیم به جامعه نیست که با افزایش حجم نمونه قابل رفع می‌باشد. در مورد این آلل در مطالعات قبلی، اطلاعاتی به دست نیامد.

آلل دیگر HLA- DRB1*0301 که در مطالعه‌ای که توسط Paras و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد [۸] به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی شد که در این مطالعه نیز رابطه معنی‌دار بدست آمد. فاصله اطمینان بدست آمده نیز قابل تعمیم به جامعه است و به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی می‌شود.

آلل دیگر در این گروه HLA- DRB1*1301 می‌باشد که در مطالعه قبلی که در هند انجام شد [۸]، نسبت به آلل HLA- DRB1*0301 بعنوان آلل پیشگیری کننده معرفی شده بود که در این مطالعه نیز با توجه به محاسبات انجام شده به عنوان یک آلل پیشگیری کننده معرفی می‌شود.

در مطالعات دیگر اطلاعاتی راجع به این آلل بدست نیامد.

آلل HLA دیگر HLA- DQB1*0201 می‌باشد که در مطالعاتی که توسط Roe DL و همکاران در سال ۲۰۰۰ در ایالات متحده انجام شد [۴] این آلل به عنوان یک آلل مستعدکننده در نژاد آفریقایی- ایالات متحده‌ای معرفی شد که در این مطالعه نیز رابطه معنی‌دار بدست آمد که این آلل به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی می‌شود.

آلل HLA دیگر HLA- DQA1*0501 می‌باشد مقدار P معنی‌دار و فاصله اطمینان قابل تعمیم به جامعه است و به عنوان یک آلل مستعدکننده معرفی می‌شود و در مطالعات قبلی راجع به این آلل اطلاعاتی بدست نیامد.

در انتها نتیجه‌ای که از این مطالعه بدست آمد بدین صورت می‌باشد که آلل‌های زیر به عنوان آلل مستعدکننده معرفی می‌شود:

HLA- B*1302
HLA- DRB1 * 0301
HLA- DQA1 * 0501
HLA- DQB1 * 0201

و آلل زیر به عنوان یک آلل پیش‌گیرنده معرفی می‌شود:

HLA- DRB1 * 1301

پیشنهاد می‌شود با توجه به حجم کم بیماران مطالعات بیشتر با تعداد نمونه بیشتر در این زمینه انجام می‌شود که با شناخت ساختار HLA بیماران و پیدا کردن آلل‌های مستعد کننده در تصمیم‌گیری در مورد شروع زودتر درمان در این بیماران از آن استفاده شود.

References

1. Dybul M, Connors M, Fauci AS. The Immunology of Human Immunodeficiency Virus infection. In: Mandell D, and Bennett's, editors. Principles and practice of Infectious Diseases. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone; 2010. p. 1687-1700.
2. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med. 2000;343(11):782-6.
3. Gore SM, Hutchinson SJ, Brettle RP. Study requirements for investigating HLA-associated progression of HIV disease, and review. QJM. 1999;92(10):609-17.
4. Roe DL, Lewis RE, Cruse JM. Association of HLA-DQ and -DR alleles with protection from or infection with HIV-1. Exp Mol Pathol. 2000;68(1):21-8.
5. Trachtenberg EA, Erlich HA. A review of the role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) system as a host immunogenic factor influencing HIV transmission and progression to AIDS. In: Korber B, Brander C, Haynes B, Koup RA, Kuiken C, Moore JP, et al. editors. HIV molecular immunology, 2001. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico; 2001.
6. Trachtenberg E, Korber B, Sollars C, Kepler TB, Hraber PT, Hayes E, et al. Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. Nat Med. 2003;9(7):928-35.
7. Borghans JA, Molgaard A, de Boer RJ, Kesmir C. HLA alleles associated with slow progression to AIDS truly prefer to present HIV-1 p24. PLoS One. 2007;2(9):e920.
8. Singh P, Kaur G, Sharma G, Mehra NK. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. Vaccine. 2008;26(24):2966-80.