

پلی مورفیسم مولکول HLA-E در بیماران تالاسمی در ایران

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۵ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵

زمینه و هدف: از آنجایی که میانگین HLA-E بیان شده در سطح سلول‌های هدف با رسپتور مهار کننده CD94/NKG2 سلول‌های NK نقش مهمی را در تنظیم ایمنی ذاتی علیه عوامل پاتوژن ایفا می‌کند، بیان متفاوت مولکول HLA-E در سطح سلول در نحوه مقاومت میزبان به ویروس‌ها و همچنین پاسخ به درمان واجد اهمیت می‌باشد. بنابراین پژوهش کنونی با هدف بررسی فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف مولکول HLA-E در بیماران تالاسمی ماژور که اغلب در معرض خطر عفونت‌های منتقله از راه انتقال خون می‌باشند، انجام گردید.

روش بررسی: پژوهش انجام‌شده از نوع مقطعی بوده که نمونه‌گیری به صورت تصادفی بر روی ۱۰۴ بیمار تالاسمی ماژور مراجعه‌کننده به درمانگاه تالاسمی بزرگسالان انتقال خون تهران بین سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ انجام شد. DNA استخراج‌شده از نمونه‌های خون بیماران با روش واکنش زنجیره پلیمرز - پرایمر مختص سکوانس (Sequence-Specific Primer Polymerase Chain Reaction, SSP-PCR) مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین جهت تایید نتایج، محصولات از نظر تعیین توالی DNA بررسی گردیدند.

یافته‌ها: از مجموع بیماران، ۴۹ مرد با فراوانی نسبی ۴۷/۱٪ و ۵۵ زن با فراوانی نسبی ۵۲/۹٪ بودند. بیماران در محدوده سنی ۱۶ تا ۴۳ سال با میانگین سنی ۳۱/۰۳ و انحراف معیار ۴/۷ قرار داشتند. فراوانی نسبی ژنوتیپ HLA-E*01010103 (۶۴/۴٪) به‌طور معناداری (P=۰/۰۰۱) بیشتر از ژنوتیپ‌های HLA-E*01010101 (۱۵/۴٪) و HLA-E*01030103 (۲۰/۲٪) بوده در حالی که تفاوتی بین فراوانی نسبی آلل‌های HLA-E*010103 (۵۲/۴٪) و HLA-E*0101 (۴۷/۶٪) وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: فراوانی ژنوتیپ HLA-E*01010103 به‌صورت معناداری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های HLA-E بوده در حالی که بین فراوانی آلل‌های HLA-E*0103 و HLA-E*0101 تفاوت معناداری وجود نداشت.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن لکوسیت انسانی E، پلی مورفیسم، تالاسمی، ژنوتیپ، روش واکنش زنجیره پلیمرز - پرایمر مختص سکوانس.

احسان صراف کازرونی

احترام السادات حسینی*

زهره شریفی

آزینا آذر کیوان

مهران قاسم‌زاده

مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شیخ فضل‌اله نوری، تقاطع بزرگراه شهید همت، جنب برج میلاد، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون. تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۱۵۷۲-۳
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

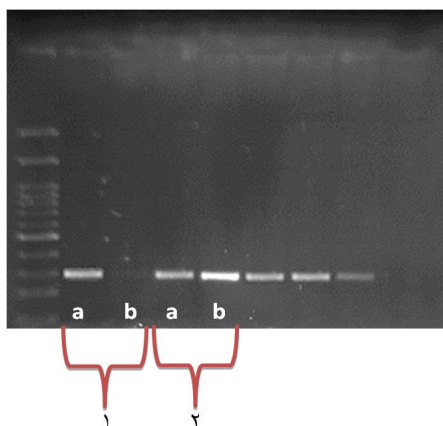
مقدمه

پروتکل‌های درمانی خود استفاده می‌نمایند، در معرض گستره وسیعی از عوارض دریافت خون قرار می‌گیرند. بنابراین احتمال آلودگی با عوامل بیماری‌زای منتقله از راه خون، به‌خصوص ویروس‌های هپاتیت B و C، از مهمترین مشکلات در این بیماران می‌باشد^{۱،۲} که پیشگیری از آن همواره از دغدغه‌های سازمان‌های انتقال خون بوده است.

بیماری تالاسمی یک کم‌خونی ارثی است که به‌علت اختلال در زنجیره سازنده هموگلوبین رخ می‌دهد.^۳ از آنجایی که بیماران تالاسمی به‌صورت مکرر از خون و فراورده‌های آن به‌عنوان یکی از

روش بررسی

پژوهش انجام شده از نوع مقطعی بوده که نمونه‌گیری از سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴ بر روی ۱۰۴ بیمار تالاسمی ماژور مراجعه‌کننده به درمانگاه تالاسمی بزرگسالان انتقال خون تهران به صورت تصادفی انجام شد. ابتدا DNA از نمونه‌های خون بیماران استخراج شده سپس توسط روش واکنش زنجیره پلیمرز- پرایمر مختص سکوانس (Sequence-Specific Primer Polymerase Chain Reaction, SSP-PCR) که در این روش از دو پرایمر اختصاصی رفت (Forward) HLA-E*0101 (5'-GGCTGCGAGCTGGGGCCAGCCA-3') و HLA-E*0103 (5'-GGCTGCGAGCTGGGGCCAGCCG-3') به همراه یک پرایمر مشترک برگشت (Reverse) استفاده شد. سپس محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. شکل ۱ الکتروفورز یک نمونه را در ژل آگاروز نشان می‌دهد. همچنین برای تایید نتایج حاصله از PCR-SSP، محصولات PCR جهت تعیین توالی DNA به شرکت ماکروژن ارسال شده و سپس در سایت NCBI بلاست گردید.



شکل ۱: الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگاروز: در چاهک a محصول واکنش DNA و پرایمر فوروارد اختصاصی آلل HLA-E*0101 و در چاهک b محصول واکنش همان DNA با پرایمر فوروارد اختصاصی آلل HLA-E*0103 بارگذاری شده است. ژنوتیپ بیمار ۱، HLA-E*01010101 (هموزیگوت آلل HLA-E*0101) می‌باشد. ژنوتیپ بیمار ۲، HLA-E*01010103 (هتروزیگوت) می‌باشد.

امروزه سعی بر آن است که با مدد گرفتن از دقیق‌ترین آزمون‌های غربالگری بر روی کیسه‌های خون‌های اهدایی، امکان بروز بیماری‌های منتقله در دریافت‌کنندگان مکرر خون کمتر گردد.^{۹-۶} مطالعات حاکی از آن است که سیستم دفاع ایمنی غیر اختصاصی در مواجهه با عوامل سرطانی و ویروسی نقش تعیین‌کننده‌ای را ایفا می‌نماید که در این راستا عملکرد سلول‌های Natural killer cells (NK) به‌عنوان اولین خط دفاعی میزبان علیه پاتوژن‌های مهاجم از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.^{۱۱} سلول‌های NK به‌طور معمول در فاز اولیه عفونت ویروسی فعال می‌گردند و از آنجا که کبد غنی از این سلول‌ها می‌باشد، از مهمترین ارگان‌هایی است که سلول‌های NK در آن فعالانه به شناسایی و حذف سلول‌های آلوده به ویروس‌هایی همچون هپاتیت C می‌پردازند.^{۱۱} هر چند در مواجهه با عوامل پاتوژن، سلول‌های NK از رسپتورهای فراوان مهاری و فعال‌کننده بهره می‌گیرند، به‌نظر می‌رسد میانکشن رسپتور مهاری CD94/NKG2 بیان شده توسط سلول‌های NK با لیگاند اختصاصیشان، مولکول HLA-E که در سلول‌های هدف بیان می‌گردد، نقش مهمی را در ایمنی ذاتی ایفا نماید.^{۱۲} پژوهش‌های انجام شده حاکی از آن است که میانکشن رسپتور مهاری NKG2A با مولکول HLA-E منجر به کاهش فعالیت کشندگی و تولید سایتوکین توسط سلول‌های NK می‌گردد،^{۱۶-۱۳} موضوعی که در شرایط پاتولوژیک ناشی از عفونت‌ها می‌تواند در فرار عامل پاتوژن از چنگال سیستم ایمنی و گسترش آن نقش داشته باشد.

تاکنون وجود ژنوتیپ‌های متفاوتی از مولکول HLA-E در جمعیت انسانی نشان داده شده است که هر یک از میزان بیان و تمایل متفاوتی با رسپتور مهاری NKG2A بر روی سلول‌های NK برخوردار می‌باشند. بنابراین با توجه به این موضوع بدیهی است که هرگونه تغییر و تفاوتی در بیان و کینتیک مولکول HLA-E می‌تواند نقش ویژه‌ای را در نحوه مقاومت میزبان به عوامل عفونی مثل ویروس‌ها و سرطان‌ها و همچنین پاسخ به درمان ایفا نماید.^{۲۱-۱۷}

بنابراین نظر به اهمیت مولکول HLA-E در تنظیم پاسخ سیستم ایمنی و همچنین تفاوت بیان این مولکول در آلل‌های مختلف آن و به‌علاوه با در نظر گرفتن در معرض خطر عفونی بودن بیماران تالاسمی ماژور به دلیل تزریق مکرر خون، پژوهش کنونی با هدف تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف مولکول HLA-E در این بیماران انجام پذیرفت.

HLA-E*0101 و HLA-E*0103 به ترتیب (۱۰۹) (۰/۵۲/۴) و (۹۹) (۰/۴۷/۶) وجود نداشت (جدول ۱-۲).

فراوانی ژنوتیپ‌های HLA-E در بیماران تالاسمی به تفکیک جنس بر اساس محاسبه فراوانی نسبی در جنس (جدول ۱-۳) و محاسبه فراوانی نسبی در ژنوتیپ (جدول ۱-۴) نشان داده شده است. آنالیزهای آماری ارتباط معناداری را بین ژنوتیپ HLA-E و جنسیت نشان نداد (P=۰/۸۹۷).

جدول ۱-۲: فراوانی مطلق و نسبی آلل‌های مختلف HLA-E در بیماران تالاسمی

مجموع	نوع آلل HLA-E		
	HLA-E*0103	HLA-E*0101	
۲۰۸	۱۰۹	۹۹	فراوانی مطلق
۱۰۰	۵۲/۴	۴۷/۶	فراوانی نسبی

برای تحلیل داده‌ها از SPSS software, version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) استفاده شد. همه P-value ها دو طرفه (Two-tailed) بوده و $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنادار محسوب شد. داده‌ها با استفاده از Chi-square test مورد ارزیابی واقع شدند.

یافته‌ها

نتایج مطالعه نشان داد که از ۱۰۴ بیمار شرکت‌کننده در این پژوهش، ۴۹ نفر مرد با فراوانی نسبی ۰/۴۷/۱ و ۵۵ نفر زن با فراوانی نسبی ۰/۵۲/۹ بودند که این بیماران در محدوده سنی ۱۶ تا ۴۳ سال با میانگین سنی ۳۱/۰۳ و انحراف معیار ۴/۷ قرار داشتند.

در گروه بیماران تالاسمیک، فراوانی ژنوتیپ HLA-E*01010103 (۶۷ نفر (۰/۶۴/۴)) به طور معناداری (P=۰/۰۰۱) بیشتر از ژنوتیپ‌های HLA-E*01010101 (۱۶ نفر (۰/۱۵/۴)) و HLA-E*01030103 (۲۱ نفر (۰/۲۰/۲)) بود (جدول ۱-۱)، همچنین تفاوتی بین فراوانی آلل‌های

جدول ۱-۱: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپ‌های مختلف HLA-E در بیماران تالاسمی

مجموع	نوع ژنوتیپ HLA-E			
	HLA-E*01010103	HLA-E*01030103	HLA-E*01010101	
۱۰۴	۶۷	۲۱	۱۶	فراوانی مطلق
۱۰۰	۶۴/۴	۲۰/۲	۱۵/۴	فراوانی نسبی

آنالیز داده‌ها با استفاده از Chi-square test انجام شد و ارتباط معناداری را بین ژنوتیپ‌های مختلف HLA-E نشان داد (P=۰/۰۰۱). $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنادار محسوب شد.

جدول ۱-۳: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپ‌های HLA-E در بیماران تالاسمی به تفکیک جنس (درصد داخل جنس)

مجموع	ژنوتیپ			جنس			
	HLA-E*01010103	HLA-E*01030103	HLA-E*01010101				
	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق			
۱۰۰	۵۵	۳۵	۲۱/۸	۱۲	۱۴/۵	۸	زن
۱۰۰	۴۹	۳۲	۱۸/۴	۹	۱۶/۳	۸	مرد
۱۰۰	۱۰۴	۶۷	۲۰/۲	۲۱	۱۵/۴	۱۶	کل

آنالیز داده‌ها با استفاده از Chi-square test انجام شد و ارتباط معناداری را بین ژنوتیپ HLA-E و جنسیت نشان نداد (P=۰/۸۹۷). $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنادار محسوب شد.

جدول ۱-۴: فراوانی مطلق و نسبی ژنوتیپ‌های HLA-E در بیماران تالاسمی به تفکیک جنس (درصد داخل ژنوتیپ)

ژنوتیپ	HLA-E*01010101		HLA-E*01030103		HLA-E*01010103		مجموع
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	
زن	۸	۵۰	۱۲	۵۷/۱	۳۵	۵۲/۹	۵۲/۹
مرد	۸	۵۰	۹	۴۲/۹	۳۲	۴۷/۱	۴۷/۱
کل	۱۶	۱۰۰	۲۱	۱۰۰	۶۷	۱۰۰	۱۰۰

آنالیز داده‌ها با استفاده از Chi-square test انجام شد و ارتباط معناداری را بین ژنوتیپ HLA-E و جنسیت نشان نداد (P=۰/۸۹۷). P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنادار محسوب شد.

بحث

HLA-E*01010103 (۵۷/۱٪) بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد (HLA-E*01010101 E*01010103، (۲۲/۲٪)، HLA-E*01030103 (۲۰/۴٪).^{۲۶} پژوهش Hosseini و همکاران در اهداکنندگان و گیرندگان پیوند سلول‌های بنیادی در استرالیا نیز حاکی از افزایش فراوانی ژنوتیپ HLA-E*01010101 E*01010103 (۵۲/۷٪) نسبت به ژنوتیپ‌های HLA-E*01010101 (۲۷/۷٪)، HLA-E*01030103 (۱۹/۶٪) بوده است.^{۲۷} که مشابه نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش کنونی می‌باشد.

در بعضی از عفونت‌های ویروسی مانند سیتومگالوویروس، و ویروس هپاتیت C و HIV، مهار سلول‌های NK توسط رسپتور مهایری NKG2A/CD94 ممکن است منجر به فرار ویروس از پاسخ ایمنی ذاتی گردد.^{۱۷ و ۲۸} در مطالعه‌ای که گروه Schulte انجام دادند ژنوتیپ HLA-E*01010101 با افزایش حمایت در برابر عفونت HCV همراه بود که این امر می‌تواند به دلیل پایداری کمتر آلل HLA-E*0101 در مقایسه با HLA-E*0103 باشد به‌طوری که افرادی که آلل HLA-E*0101 را به‌صورت هموزیگوت دارند توانایی بالاتری در سرکوب HCV به‌وسیله سلول‌های NK دارند.^{۲۹}

در مطالعه‌ای که توسط گروه Fulgencio بر روی ۳۲۱ بیمار آلوده به HIV و HCV (به‌طور همزمان) انجام گردید، نشان داده شد که آلل ۱۰۱ با احتمال افزایش کلیرانس عفونت هپاتیت C همراه بوده است.^{۳۰} جدا از بررسی ارتباط آلل‌ها و یا ژنوتیپ HLA-E با عفونت‌ها، پژوهش‌های دیگری نیز وجود دارند که گویای ارتباط بین ژنوتیپ‌های مختلف مولکول HLA-E با نتایج پس از پیوند مغز استخوان و یا سلول‌های بنیادی خون‌ساز در بیماران با بدخیمی‌های خونی می‌باشند. پژوهش‌های گفته‌شده پیشنهاد می‌نمایند که ژنوتیپ HLA-E*01030103 نقش

شناخت نقش مولکول HLA-E در تنظیم فعالیت‌های سلول NK موجب شده است تا پژوهش‌های گسترده‌ای در مورد این مولکول صورت پذیرد. در ابتدا بیشتر پژوهش‌ها تنها بر پایه ارزیابی بیان مولکول HLA-E بر سطح سلول‌های مختلف توموری، آلوده به ویروس و یا سالم متمرکز بود اما به مرور زمان شناخت آلل‌های متفاوت این ژن و همچنین تفاوت‌های ساختاری محصولات هر کدام از آلل‌ها، پژوهش‌گران را بر آن داشت تا به مطالعه ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف HLA-E و استعداد ابتلا به طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند بیماری‌های خودایمن، تومورها و بیماری‌های ویروسی بپردازند. پژوهش کنونی حاکی از آن بوده است که در بیماران تالاسمیک فراوانی ژنوتیپ HLA-E*01010103 به‌طور معناداری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد در حالی که تفاوت معناداری بین فراوانی آلل‌های HLA-E*0103 و HLA-E*0101 دیده نشد.

در یکی از پژوهش‌ها فراوانی آلل‌های HLA-E*0101 و HLA-E*0103 در جمعیت‌های قفقازی، آفریقاییان آمریکایی تبار و اسپانیایی‌ها برابر و حدود ۵۰٪ بوده است.^{۳۳ و ۳۲} در مطالعه دیگری که بر روی افراد ژاپنی صورت گرفت، فراوانی آلل HLA-E*0103 (۶/۸٪) بیشتر از آلل HLA-E*0101 (۳۲٪) گزارش گردیده است.^{۳۴} این در حالی است که مطالعه انجام‌شده توسط گروه Carvalho در اهداکنندگان مغز استخوان در جنوب برزیل، حاکی از بیشتر بودن فراوانی آلل HLA-E*0101 نسبت به آلل HLA-E*0103 بوده است.^{۳۵}

جدای از بررسی آلل‌ها، در مطالعه‌ای که بر روی نژاد آفریقایی تبار صورت گرفت نشان داده شده است که فراوانی ژنوتیپ HLA-

خطر عفونت‌ها محسوب می‌گردند این تفاوت ژنوتیپی نقش مهمی را در استعداد ابتلا، مقاومت و پاسخ به درمان عفونت‌های منتقله از راه انتقال خون ایفا نماید. در این راستا یافته‌های ما که حاکی از وجود ژنوتیپ‌های مختلف HLA-E در بیماران تالاسمی است می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای جهت مطالعات آینده در نظر گرفته شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که تعیین ژنوتیپ بیماران تالاسمی به‌عنوان فاکتوری پیش‌بینی‌کننده جهت احتمال ابتلا به عفونت در نظر گرفته شود. داده‌های پژوهش کنونی نشان داد که در بیماران تالاسمی فراوانی ژنوتیپ HLA-E*01010103 به‌طور معناداری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های HA-E بود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثر ژنوتیپ‌های مختلف مولکول HLA-E در پاسخ به درمان ویروس هپاتیت C در بیماران تالاسمی مراجعه‌کننده به درمانگاه تالاسمی بزرگسال انتقال خون" در سال ۱۳۹۲ و به کد ۱۶۷۷-۳۳-۰۱-۱۳۹۲ می‌باشد، همچنین این مقاله منتج از پایان‌نامه مصوب مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. نویسندگان از همکاری‌های مجدانه درمانگاه تالاسمی تهران، مرکز تحقیقات انتقال خون و همچنین از زحمات خانم مهندس مریم‌السادات طاهری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

حمایتی بر علیه بیماری پیوند علیه میزبان و عود پس از پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایفا می‌کند و همچنین بین این ژنوتیپ و بقای عمر بیشتر به‌دنبال پیوند، ارتباط معناداری وجود دارد.^{۳۷،۳۸}

پلی مورفیسم HLA-E در برخی از بدخیمی‌ها نیز بررسی شده است. برای نمونه Hirankam و همکاران، مطالعه‌ای را روی افراد مبتلا به سرطان نازوفارنکس صورت دادند، آن‌ها مشاهده کردند که ژنوتیپ HLA-E*01030103 در این بیماران شیوع بالاتری دارد.^{۱۹} Zhou و همکاران ارتباط پلی مورفیسم ژن HLA-E را با استعداد ژنتیکی سرطان پستان در ۲۰۰ بیمار مبتلا به این بیماری بررسی و مشاهده کردند که در این بیماران شیوع ژنوتیپ HLA-E*01030103 به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل سالم بود.^{۲۰} پژوهش‌ها نشان داده است که میزان بیان مولکول HLA-E*0103 در مقایسه با HLA-E*0101 بالاتر است. بنابراین پیشنهاد شده است که در افراد دارای آلل HLA-E*0103، مولکول‌های HLA-E در مواجهه با رسپتورهای NKG2/CD94 سلول‌های NK واکنش قوی‌تری را نشان می‌دهند. به‌عبارتی میزان اویدیتی مولکول HLA-E*0103 نسبت به HLA-E*0101 در واکنش به سلول‌های NK بالاتر خواهد بود. با توجه به نقش تعیین‌کننده‌ی سلول‌های NK در مقابله با عفونت‌ها و تنظیم سیستم ایمنی ذاتی، به‌نظر می‌رسد که در بیماران تالاسمیک که از مهمترین گروه‌های در معرض

References

- Prati D. Benefits and complications of regular blood transfusion in patients with beta-thalassaemia major. *Vox Sang* 2000;79(3):129-37.
- Wonke B. Clinical management of beta-thalassemia major. *Semin Hematol* 2001;38(4):350-9.
- Bhattacharya DK, Bhattacharjee S, De M, Lahiri P. Prevalence of hepatitis C in transfusion dependent thalassaemics & haemophilics. *Indian J Med Res* 1991;94:430-2.
- el-Nanawy AA, el Azzouni OF, Soliman AT, Amer AE, Demian RS, el-Sayed HM. Prevalence of hepatitis-C antibody seropositivity in healthy Egyptian children and four high risk groups. *J Trop Pediatr* 1995;41(6):341-3.
- Cano H, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. *Transfus Med* 2003;13(5):259-66.
- Chung JL, Kao JH, Kong MS, Yang CP, Hung IJ, Lin TY. Hepatitis C and G virus infections in polytransfused children. *Eur J Pediatr* 1997;156(7):546-9.
- Fiebig EW, Busch MP. Emerging infections in transfusion medicine. *Clin Lab Med* 2004;24(3):797-823, viii.
- Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
- Tawk HM, Vickery K, Bisset L, Lo SK, Cossart YE; Infection in Endoscopy Study Group. The significance of transfusion in the past as a risk for current hepatitis B and hepatitis C infection: a study in endoscopy patients. *Transfusion* 2005;45(5):807-13.
- Ahmadi M, Hosseini E, Pourfatollah A, Ghasemzadeh M, Karimi G. The role of amnion membrane-derived mesenchymal stem cells on differentiation and expansion of natural killer cell progenitors originated from umbilical cord blood mononuclear cells. *Biotech Health Sci* 2015;2(4):e33684.
- Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol* 2004;76(4):743-59.
- Iwaszko M, Bogunia-Kubik K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011;59(5):353-67.
- Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Peña J, et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 2002;38(9):637-60.
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391(6669):795-9.

15. Sullivan LC, Hoare HL, McCluskey J, Rossjohn J, Brooks AG. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol* 2006 Sep;27(9):413-20.
16. Ghasemzadeh M, Hosseini E, Schwarer AP, Pourfathollah AA. NK cell maturation to CD56(dim) subset associated with high levels of NCRs overrides the inhibitory effect of NKG2A and recovers impaired NK cell cytolytic potential after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2016;43:58-65.
17. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* 2005;166(2):443-53.
18. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Kupfer B, Ahlenstiel G, Feldmann G, et al. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* 2005;10(1):95-107.
19. Hirankam N, Kimkong I, Mutirangura A. HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tissue Antigens* 2004;64(5):588-92.
20. Zhou Y, Wu Z, Tang Y, Jia T. HLA-E gene polymorphisms and plasma soluble HLA-E levels and their relationship with genetic susceptibility to breast cancer. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2015;31(4):524-7.
21. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J Infect Dis* 2006;193(2):298-301.
22. Grimsley C, Ober C. Population genetic studies of HLA-E: evidence for selection. *Hum Immunol* 1997;52(1):33-40.
23. Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Vargas-Alarcón G, Varela P, Diaz-Campos N, Alvarez M, et al. Description of a new HLA-E (E*01031) allele and its frequency in the Spanish population. *Hum Immunol* 1997;54(1):69-73.
24. Kanai T, Fujii T, Keicho N, Tokunaga K, Yamashita T, Hyodo H, et al. Polymorphism of human leukocyte antigen-E gene in the Japanese population with or without recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001;45(3):168-73.
25. Carvalho dos Santos L1, Tureck LV, Wowk PF, Mattar SB, Gelmini GF, Magalhães JC, et al. HLA-E polymorphisms in an Afro-descendant Southern Brazilian population. *Hum Immunol* 2013;74(2):199-202.
26. Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, Roger M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. The ZVITAMBO Study Group. *Hum Immunol* 2000;61(11):1150-6.
27. Hosseini E, Schwarer AP2, Ghasemzadeh M3. Do human leukocyte antigen E polymorphisms influence graft-versus-leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Exp Hematol* 2015;43(3):149-57.
28. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000;287(5455):1031.
29. Schulte D, Vogel M, Langhans B, Kramer B, Korner C, Nischalke HD, et al. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *J Infect Dis* 2009;200(9):1397-401.
30. Guzmán-Fulgencio M, Berenguer J, Rallon N, Fernández-Rodríguez A, Miralles P, Soriano V, et al. HLA-E variants are associated with sustained virological response in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients on hepatitis C virus therapy. *AIDS* 2013;27(8):1231-8.
31. Hosseini E, Schwarer AP, Jalali A, Ghasemzadeh M. The impact of HLA-E polymorphisms on relapse following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2013;37(5):516-9.
32. Hosseini E, Schwarer AP, Ghasemzadeh M. The impact of HLA-E polymorphisms in graft-versus-host disease following HLA-E matched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012;11(1):15-21.

HLA-E polymorphism study in Iranian thalassemic patients

Ehsan Sarraf Kazerooni M.Sc.
Ehteramolsadat Hosseini Ph.D.*
Zohreh Sharifi Ph.D.
Azita Azarkeivan M.D.
Mehran Ghasemzadeh Ph.D.

Blood Transfusion Research Center,
High Institute for Research and
Education in Transfusion Medicine,
Tehran, Iran.

* Corresponding author: Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Iranian Blood Transfusion Organization Building, Hemmat Express Way, Next to the Milad Tower, Tehran 14665-1157, Iran.
Tel: +98 21 88601572-3
E-mail: e.hosseini10@yahoo.com.au

Abstract

Received: 26 Nov. 2015 Revised: 04 May 2016 Accepted: 20 Sep. 2016 Available online: 26 Sep. 2016

Background: Human leukocyte antigen E is a member of non classical HLA class I. Interaction between HLA-E molecule on the target cells and inhibitory CD94/NKG2A receptor on the cell surface of natural killer (NK) cells has an important role in the regulation of immune system against pathogens; therefore different cell surface expression of HLA-E molecule plays an important role in host resistance against viral infections as well as host response to treatment. Considering this fact, we analyzed the frequency of different HLA-E genotypes (HLA-E*01010101, HLA-E*01030103, HLA-E*01010103) in major thalassemic patients who underwent frequent transfusion therapy and are thus more susceptible to infectious diseases.

Methods: This study was a cross-sectional study of 104 major thalassemic patients who referred to Tehran Thalassemia Clinic between the years 2015 to 2016. Blood DNA was extracted and proliferated by sequence-specific primer polymerase chain reaction (SSP PCR). The PCR product was subjected to electrophoresis on 1.5 percent agarose gel then DNA fragment bands on the gel were detected by exposing to UV light. Furthermore, PCR products were also subjected to sequencing analysis for further confirmation.

Results: From 104 patients in this study, 49 (47.1%) were man and 55 (52.9%) were women. These patients were in the age range of 16 to 43 years (mean±SD; 31.03±4.7 year). The frequency of HLA-E*01010103 genotype (64.4 percent) was significantly ($P= 0.001$) higher than the genotypes of HLA-E*01010101 (15.4%) and HLA-E*01030103 (20.2%) whereas there was no difference between the frequency of HLA-E*0103 allele (52.4%) and HLA-E*0101 (47.6%).

Conclusion: This is the first study that examined the HLA-E polymorphisms in Iranian thalassemic patients referred to Tehran Thalassemia Clinic. This study has shown that the frequency of HLA-E*01010103 genotype was significantly higher than other genotypes of HLA-E whereas there was no difference between the frequency of HLA-E*0103 allele and HLA-E*0101 allele. Whether different frequencies of HLA-E genotype may affect thalassemic patients' susceptibility to blood-borne infections will be of interest for future studies.

Keywords: cross-sectional studies, genotype, HLA-E, polymorphism, sequence-specific primer polymerase chain reaction, thalassemia.