REVIEW ARTICLE

A Review on Incidence of Alloimmunization with Incompatible Rh Blood Group Transfusion and Role of Molecular Methods in Finding Compatible Blood Units in Multi Transfused Patients

Mohammad Taher Hojati[1],
Mohammad Reza Mahdavi[2]

[1] PhD Student in Hematology and Transfusion Medicine, Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, Talassemia Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 24, 2014 ; Accepted July 21, 2014)

Abstract

Alloimunization reduces RBCs lifespan in circulation. Identification of phenotypes of RBCs could be helpful in reducing the rate of alloimunization. But often, due to persistence of donor RBC`s in patients circulation, precise identification of blood group antigens in multi transfusion patient would be difficult. Today, DNA technology increased our knowledge in recognizing the molecular basis of blood group antigens. This knowledge helps in predicting profiles of blood groups in patients and overcoming problems of agglutination method. But theoretically, it seems, because of contamination of donor`s WBCs in patients circulation and possibility of their contamination with patient`s WBCs, application of molecular method by WBCs may not be reliable. However, some studies showed that using patient's WBCs can infinitively be applicable in identification of polymorphism of blood group antigens by molecular methods, even in newly transfused patients.

Keywords: Alloimunization, phenotypes of RBCs, agglutination method, molecular methods

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(115): 192-202 (Persian).

مـــروری

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـــزشـــکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۵ مرداد سال ۱۳۹۳ (۲۰۲-۱۹۲)

مروری بر بروز آلوایمونیزاسیون ناشی از ناسازگاری آنتی ژن های گروه خونی Rh و نقش راه کارهای مولکولی در یافتن واحدهای خونی سازگار

محمد طاهر حجتی[1]

محمد رضا مهدوی

چکیده

با ایجاد آلوایمونیزاسیون، عمر گلبول‌های قرمز کاهش یافته و نیاز به خون افزایش می‌یابد. تعیین فنوتیپ گلبول‌های قرمز می‌تواند در جلوگیری از بروز آلوآنتی بادی‌های احتمالی ضروری باشد اما در اغلب موارد تعیین دقیق آنتی ژن‌های گروه خونی در بیمارانی که در آن‌ها انتقال خون صورت می‌گیرد به علت وجود گلبول‌های قرمز فرد دهنده خون در گردش خون بیماران، مشکل می‌باشد. تکنولوژی استفاده از DNA دانش ما را نسبت به اساس مولکولی بسیاری از آنتی ژن‌های گروه‌های خونی افزایش داده است. این دانش به ما اجازه پیشگویی در مورد پروفایل آنتی ژنی گروه‌های خونی هر فرد را می‌دهد که می‌تواند بر مشکلات استفاده از روش‌های آگلوتیناسیون در تعیین گروه‌های خونی غلبه کند. یکی از مشکلاتی که به صورت نظری درکاربرد DNA به دست آمده از گلبول‌های سفید بیمار جهت تعیین ژنوتیپ گروه‌های خونی مطرح می‌باشد، آلودگی احتمالی آن با گلبول‌های سفید فرد دهنده می‌باشد که در کیسه های خونی وجود دارد؛ اما مطالعات صورت گرفته روی گلبول‌های سفید بیماران نشان داد که این سلول‌ها می‌توانند به صورت قطعی در تعیین پلی‌مورفیسم گروه‌های خونی به روش PCR، حتی زمانی که فرد بیمار به تازگی خون دریافت کرده باشد، مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: آلوایمونیزاسیون، فنوتیپ گلبول‌های قرمز، روش‌های آگلوتیناسیون، روش‌های مولکولی

مقدمه

آلوایمیونیزاسیون می‌تواند منشاء مشکلات مهمی در مدیریت انتقال خون باشد. با ایجادآلوایمونیزاسیون، عمر گلبول‌های قرمز کاهش یافته و نیاز به خون در بیماران افزایش می‌یابد. با شناسایی نوع آنتی ژن مسبب آلوایمونیزاسیون و انتقال واحدهای خونی سازگار، از تخریب زود هنگام گلبول‌های قرمز ممانعت به عمل آمده و از افزایش نیاز به خون و عوارض ناشی از تزریقات مکرر خون جلوگیری می‌گردد(۱). آلوایمونیزاسیون نتیجه واکنش سیستم ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های بیگانه می‌باشد. این عارضه پس از مواجهه قبلی با اجزای خونی ایجاد می‌گردد و سطح این آنتی‌بادی‌ها پس از روز دوم به حداکثر میزان خود می‌رسد. مطالعات متعدد نشان داد که به طور تخمینی شیوع آلوایمونیزاسیون گلبول‌های قرمز به ازای هر واحد تزریق خون، ۱ تا ۱/۶ درصد و در بیماران دارای انتقال خون مکرر (تالاسمی، لوسمی، و...) به ۵ تا ۲۱ درصد می‌رسد(۲). پاسخ‌های ایمنی اولیه به آنتی‌ژن‌های بیگانه، آهسته بوده و آنتی‌بادی‌های تولید شده از نوع IgM می‌باشد اما آلو آنتی‌بادی‌های تولید شده در بدن

مولف مسئول: محمدرضا مهدوی– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdavi899@gmail.com

۱. دانشجوی دکترای خون شناسی و طب انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۳/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۴/۳۰

بیماران پس از تماس مجدد با آنتی ژن‌های بیگانه گلبول قرمز (متعاقب تزریق خون، حاملگی و...)، اغلب از نوع IgG هستند و با افزایش سرعت پاسخ‌دهی و اختصاصیت برعلیه آنتی‌ژن‌های بیگانه عمل می‌کنند(۴،۳). در این میان، میزان بروز آلوایمیونیزاسیون بر علیه آنتی ژن‌های گلبول‌های قرمز به خصوص زیر گروه‌های سیستم گروه خونی Rh در بیماران دچار هموگلوبینوپاتی، مثل بیماران بتا تالاسمی که دارای تزریق‌های خون متعددی می‌باشند، به علت عدم شناسایی آن‌ها در آزمایشات روتین، نسبتا بالا می‌باشد(۵). در جدول شماره ۱ به تعدادی از مطالعات صورت گرفته در ایران طی سال‌های اخیر اشاره شده است.

جدول شماره ۱: درصد فراوانی شیوع آلوایمونیزاسیون به گروه خونی Rh در جمعیت ایران در مطالعات متعدد

نویسنده	سال انتشار	تعداد نمونه	میزان آلوایمونیزاسیون	درصد آلوایمونیزاسیون علیه آنتی ژن های Rh	منبع
هیرادفر	۲۰۱۰	۱۳۳	۳۱/۵۷	۵۵	۷
انصاری	۲۰۰۴	۴۵۸	۱۱/۸	*۸۱/۶	۸
میرزائیان	۲۰۱۳	۳۸۵	۱۷/۹	۲۷	۹
کوثریان	۲۰۱۲	۲۱۸	۴۰/۴	**۵۰>	۱۰
کیخایی	۲۰۱۳	۱۳۳	۳۲/۰۶	۱۸/۷	۱۱
صادقیان	۲۰۰۹	۳۱۳	۲/۸۷	**۸۸>	۱۲
آذرکیوان	۲۰۱۱	۸۳۵	-	**۲۰>	۱۳

* مجموع آنتی بادی های گروه های خونی Rh و kel

** مجموع آنتی بادی های علیه زیرگروه های گروه های خونی Rh بهمراه شیوع بیش از یک آنتی بادی ضد گروه های خونی Rh

تعیین فنوتیپ گلبول‌های قرمز بیماران و کیسه های خون تزریقی می‌تواند به میزان زیادی موجب کاهش تولید آلوآنتی‌بادی گردد اما در اغلب موارد تعیین دقیق آنتی ژن‌های گروه خونی در بیمارانی که در آن‌ها انتقال خون صورت می‌گیرد به علت وجود گلبول‌های قرمز فرد دهنده خون در گردش خون بیماران، مشکل می‌باشد. لذا استفاده از روش‌های پیشرفته‌تر می‌تواند بر این مشکل غلبه کند(۶). ما در این مقاله مروری بر آنیم تا با شناسایی اهمیت زیرگروه‌های سیستم گروه خونی Rh، به ارائه راهکارهایی در جهت شناسایی بهتر آن‌ها و کاهش اثرات ایمونولوژیکی آن‌ها در بدن افراد دارای ترانسفیوژن متعدد بپردازیم.

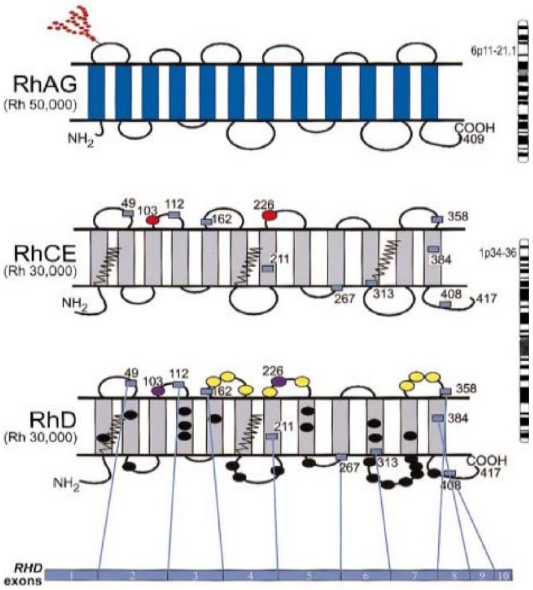
گروه خونی Rh

سیستم گروه خونی Rh یکی از متنوع‌ترین و ایمونوژن‌ترین سیستم‌های گروه خونی می‌باشد که در انسان شناسایی شده است. این سیستم گروه خونی، دارای بیش از ۵۰ آنتی ژن مستقل بوده و بعد از ABO دارای بیش‌ترین علائم کلینیکی در طب انتقال خون می‌باشد. آنتی‌ژن‌های شایع Rh عبارتند از: D، C، c ، E و e که به صورت CDE نوشته می‌شوند. در موارد حذف‌های نادر از جای خالی به جای نوشتن ژن حذف شده استفاده می‌گردد که نشان‌دهنده فقدان آنتی ژن مورد نظر می‌باشد. مثل De که نشان دهنده فقدان آنتی ژن‌های E و c می‌باشد. در مورد فنوتیپ Rh-null نیز باید گفته شود که در این فنوتیپ هیچ‌کدام از آنتی ژن‌های Rh بیان نمی‌شوند(۱۵،۱۴). پروتئین‌های Rh حمل‌کننده آنتی‌ژن‌های Rh فقط در صورت وجود RHAG[1]، در سطح گلبول‌های قرمز بیان می‌شوند. همسان بودن توالی اسید آمینه‌های بین Rh و پروتئین‌های RHAG نشان‌گر ارتباط اجدادی آن‌ها و در مجموع قرار گرفتن آن‌ها در "خانواده پروتئین Rh" می‌باشد. ژن‌های کدکننده RhD و RhCcEe دارای همولوژی بالایی با یکدیگر می‌باشند اما ژن‌های کدکننده RHAG حدوداً ۴۰ درصد همولوژی با ژن‌های فوق‌الذکر را دارا می‌باشد. هر کدام از این سه ژن دارای ۱۰ اگزون می‌باشند، طول RHD و RHCE به اندازه ۶۹Kb و RHAG، ۳۲Kb می‌باشد. نمودارهای قدرت آب دوستی، تجزیه‌های ایمونوشیمیایی و اطلاعات کسب شده به واسطه جهش‌های ایجاد شده بیان‌گر این مسئله بوده که پروتئین‌های Rh و RHAG دارای ۱۲ ناحیه غشاء گذر بوده و هر دو انتهای آمینی و کربوکسیلی آن در داخل سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند (تصویر شماره ۱) (۱۷،۱۶).

اساس مولکولی زیرگروه‌های گروه خونی Rh

در گروه خونی Rh، تفاوت آلل‌های RhC و Rhc، به دلیل جهش‌های نقطه ای در ژن RhCE در موقعیت‌های

1. Rh-associated glycoprotein



تصویر شماره ۱: مدلی از وضعیت قرار گرفتن RhAG، RhCE و RhD

RhAG شامل ۴۰۹ اسید آمینه بوده که به وسیله ژن RHAG که بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارد کد می‌شود. RhCE و RhD به واسطه ژن‌های RHCE و RhD که در نزدیکی یکدیگر روی کروموزوم شماره یک کد می‌شوند. هر یک از دومن‌های ده‌گانه پروتئین RhD به وسیله شماره‌گذاری مشخص شده‌اند. از اسید آمینه‌های اختصاصی RhD، هشت عدد از آن در سطح خارجی غشاء (دایره‌های زرد رنگ) و ۲۴ عدد آن‌ها در داخل غشای سیتوپلاسمی و قسمت سیتوزولی قرار دارند. دایره های قرمز نشان دهنده اسید آمینه‌های ضروری برای RhC/c (Ser103pro) و RhE/e (Pro226Ala) و دایره های بنفش نشان دهنده Ser103 و Ala226 روی پروتئین RhD می‌باشد. خطوط زیگزاگ هم نشان گر موتیف‌های Sys-Leu-Pro می‌باشند.

باز ۴۸ از اگزون ۱ و بازهای ۱۵۰ ، ۱۷۸ ، ۲۰۱، ۲۰۳ و ۳۰۷ از اگزون ۲ می‌باشد(۱۸). جابه‌جایی این شش نوکلئوتید موجب تغییر در ۴ اسید آمینه می‌گردد که در این میان اسید آمینه شماره ۱۰۳ به علت قرار گرفتن در ناحیه بیرونی پروتئین مربوطه حائز اهمیت می‌باشد، اما پلی‌مورفیسم در نوکلئوتید شماره ۳۰۷ موجب تظاهر فنوتیپ RhC می‌گردد(۱۹). اما تفاوت بین دو الل RhE و Rhe از جانشینی نوکلئوتید C به جای G در جایگاه ۶۷۶ در اگزون ۵ از ژن RhCE ناشی می‌گردد که در آن پرولین به آلانین تبدیل می‌شود(۲۰). با توجه به شناخته شدن جایگاه جهش‌های تاثیرگذار در به وجود آمدن این پلی‌مورفیسم‌ها، تلاش‌های زیادی در طراحی و اجرای روش مناسب ژنوتایپینگ زیر گروه‌های گروه خونی Rh صورت گرفته است. در همین راستا، Tanaka و همکاران جهت تعیین دقیق وجود ژن‌های مربوطه، به تعیین توالی در پروموتور ژن RhCE پرداختند و آن را با توالی‌های گزارش شده قبلی مقایسه کردند. این مقایسه نشان داد که نوکلئوتید ۲۴۶۸- در ناحیه پروموتور ژن‌های RhD و RhCE و نوکلئوتید ۲۲۹۲- در ژن‌های RhC و Rhc با هم متفاوت هستند و بر همین اساس جهت تمایز ژن‌های c و C اقدام به طراحی روش PCR-RFLP نمودند که آن را به واسطه روش‌های قبلی مورد بررسی قرار دادند که نتیجه امر کاملا بیان‌گر صحت روش طراحی شده آن‌ها در ژنوتایپینگ ژن‌های فوق بوده است(۲۱). در روشی دیگر schoot و همکارانش با تکیه بر تفاوت نوکلئوتیدی در جایگاه ۶۷۶ از ژن RhCE که در بروز آنتی‌ژن‌های E و e موثر بودند اقدام به طراحی پرایمر اختصاصی جهت انجام (ASPA)[1] نمودند، به‌طوری‌که پرایمر Sence طراحی شده برای تشخیص ژن E در ناحیه ۶۷۶ قادر به شناسایی نوکلئوتید سیتوزین و پرایمر Sence طراحی شده برای تشخیص ژن e در ناحیه ۶۷۶ قادر به شناسایی نوکلئوتید گوانین بود، ولی پرایمر anti sence در هر دو یکسان بود. این گروه با انجام ژنوتایپینگ بر روی ۱۵۸ نمونه فرد سالم صحت روش خود را اثبات نمودند(۲۲).

آلوایمیونیزاسیون ناشی از تزریق گلبول‌های قرمز

آلوایمیونیزاسیون گلبول‌های قرمز ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین‌دهنده و گیرنده خون یا مادر و جنین می‌باشد. هم‌چنین ایمونوژنیسیتی به قابلیت آنتی‌ژن در تحریک و ایجاد پاسخ ایمنی خاص و تولید سلول‌های موثر در سیستم ایمنی یا آنتی‌بادی‌ها اطلاق می‌گردد. بعد از انتقال خون ۱ تا ۳ درصد از دریافت‌کنندگان خون به واسطه وجود آنتی‌بادی‌ها در مقابل آنتی ژن‌های گروه‌های خونی واکنش نشان می‌دهند. عواملی چون

1. Allele specific Primer amplification

حالات شیمیایی و فیزیکی آنتی ژن، تعداد جایگاه‌های آنتی‌ژنی، میزان تجزیه پذیری آنتی‌ژنی و این‌که آیا این پاسخ وابسته به T-cell می‌باشد یا نه، بر نوع و میزان پاسخ‌های میزبان اثر می‌گذارد(۲۳). ایمونوژن‌ترین گروه‌های خونی، گروه‌های A و B هستند چراکه آنتی‌بادی‌های طبیعی علیه هر کدام از آن‌ها در افراد فاقد آنتی ژن مورد نظر به وجود آمده است. با مطالعه قدرت آلوآنتی‌بادی‌های ناشی از فرآیندهای ایمونولوژیک، به نظر می‌رسد که به جز سیستم گروه خونی ABO، آنتی‌ژن D دارای بالاترین قدرت ایمونولوژیکی در مقایسه با سایر آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی می‌باشد(۲۴). هرچند کیسه‌های خونی قبل از اقدام به تزریق، کاملا از نظر سازگاری سیستم گروه خونی ABO و آنتی ژن RhD بررسی می‌شوند، اما درصورتی که فرد دهنده دارای آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی فرعی باشد و فرد گیرنده فاقد آن ها باشد، می‌تواند منجر به آلوایمیونیزاسیون گردد. از این گروه‌های خونی می‌توان به آنتی‌ژن‌های سیستم گروه خونی Rh، Kell، Duffy و Kidd اشاره کرد که از نظر بالینی مهم می‌باشند و با ایجاد واکنش‌های انتقال خون در برخی موارد موجب محدودیت تزریق خون سالم و بی‌خطر برای بیماران می‌گردند(۲۵)؛ اما بیش‌ترین علائم کلینیکی حاصل از آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های سطحی گلبول‌های قرمز به وسیله IgG صورت می‌گیرد که حاصل ایمونیزاسیون فرد گیرنده در پاسخ به آنتی‌ژن‌های تظاهر یافته سطحی گلبول‌های قرمز فرد دهنده می‌باشد که فردگیرنده فاقد آن می‌باشد. این علائم در مواردی چون انتقال خون، خونریزی‌های حین بارداری یا زایمان می‌باشد که می‌توانند با مخلوط شدن خون مادر و نوزاد بروز پیداکنند(۲۶). در کنار فاکتورهای ژنتیکی، فاکتورهای نا شناخته زیادی وجود دارند که ممکن است بر سیستم ایمنی تاثیرگذار باشند. مشاهده شد که تزریق داخل عروقی یک آنتی‌ژن خاص با غلظت بالا و ماندگاری طولانی، موجب حذف T cellهای واکنش‌دهنده علیه آن می‌گردد. در این رابطه مسئله جالب آن است که گلبول‌های قرمز نگهداری شده با مدت طولانی به همراه تعداد زیادی از سلول‌های آپوپتوتیک، موجب ایجاد پاسخ‌های ایمنی متفاوتی در مقایسه با گلبول های قرمز تازه می‌شوند(۲۹-۲۷). بروز واکنش های تاخیری انتقال خون، معمولا ۵ تا ۱۴ روز پس از تزریق رخ می‌دهند. در این فرآیند آنتی‌بادی‌های IgG متصل به گلبول‌های قرمز بیگانه به علت عدم توانایی در فعال‌سازی کمپلمان، موجب از بین رفتن خارج عروقی آن‌ها در اعضایی چون کبد و طحال به واسطه سیستم رتیکولواندوتلیال (RES) می‌گردند(۳۲-۳۰).

مواردی که در آن ها استفاده از تست های مولکولی بر روش آگلوتیناسیون مقدم می‌باشد :

تکنولوژی استفاده از DNA دانش ما را نسبت به اساس مولکولی بسیاری از آنتی ژن‌های گروه‌های خونی افزایش داده است. بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های گروه‌های خونی به واسطه جهش‌های نقطه‌ای در ژن به وجود می‌آیند. این دانش به ما اجازه پیشگویی در مورد پروفایل آنتی‌ژنی گروه‌های خونی هر فرد را می‌دهد که می‌تواند بر مشکلات استفاده از روش‌های آگلوتیناسیون در تعیین گروه های خونی غلبه کند(۳۳).

در صد سال گذشته آزمایش آگلوتیناسیون، روشی استاندارد در تعیین آنتی‌ژن‌های خونی بود اما دارای محدودیت‌هایی است که شامل موارد زیر می‌باشد:

الف. تعیین گروه خونی در بیماران دارای انتقال خون‌های متعدد

در بیمارانی که به‌صورت طولانی مدت حجم زیادی از خون دریافت می‌کنند، وجود گلبول‌های قرمز فرد خون‌دهنده در خون محیطی آن‌ها موجب عدم صحت در تعیین آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی آن‌ها به روش آگلوتیناسیون می‌گردد. تعیین ژنوتایپی گروه‌های خونی بر این مشکل غلبه کرده است. در بیماران وابسته به انتقال خون که در آن‌ها آلوآنتی بادی تولید شده است، تعیین کلیه آنتی‌ژن‌های گروه خونی که بیمار می‌تواند در مقابل آن حساس شود، مهم و ضروری به نظر می‌رسد(۳۴).

ب. تعیین گروه خونی در بیمارانی که تست کومبس (آنتی گلبولین) مستقیم آن‌ها مثبت می‌باشد:

در بیمارانی که دچار آنمی‌همولیتیک اتوایمیون یا پوشیده شدن سطح گلبول‌های قرمز به واسطه ایمونوگلبولین‌ها هستند، در اغلب موارد موجب عدم اعتبار تست آنتی‌گلبولین غیر مستقیم در تعیین گروه‌های خونی می‌گردد. عمده این ایمونوگولبولین‌ها IgG می‌باشند. حذف IgG از محیط انجام آزمایش نیز در بسیاری از موارد موثر نبوده و می‌تواند موجب تخریب آنتی‌ژن‌های مورد بررسی شود. در این مورد نیز استفاده از تعیین ژنوتایپی گروه‌های خونی می‌تواند در رفع مشکل مفید باشد(۳۵).

ج. تعیین گروه خونی در جنین:

روش تعیین مولکولی گروه‌های خونی قبل از تولد در تعیین این مسئله که آیا جنین آنتی‌ژن‌هایی از پدر را به ارث برده است که مادر فاقد آن بوده و ممکن است علیه آن آنتی‌بادی بسازد، موثر است. هرگاه جنین از نظر وجود آنتی‌ژن‌های مورد نظر منفی باشد می توان گفت که خطر بروز بیماری همولیتیک دوره نوزادی (HDN)[1] یا ترومبوسیتوپنی نوزادی ناشی از آلوایمونیزاسیون (NAIT)[2] در این بیماران منتفی می‌باشد و مادر نیازی به تجویز عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی ندارد.

به این منظور DNA جنین می‌تواند از سلول‌های به دست آمده از آمنیوسنتز و نمونه‌گیری از پرزهای جفتی (CVS)[3] استخراج گردد. هم‌چنین می‌توان از DNA آزاد مشتق شده از سلول‌های جنین که تقریبا از هفته‌های پنجم جنینی در پلاسمای مادر گردش می‌کند نیز برای انجام آزمایش استفاده کرد(۳۶).

د. حل اختلافات ناشی از تعیین گروه‌های خونی به روش سرولوژیکی:

گروه‌بندی سرولوژیکی گروه‌های خونی به ویژه اگر به وسیله معرف‌های آنتی‌بادی مونوکلونال مختلف انجام گیرد، می‌تواند موجب نتایج متفاوتی شود. بسیاری از جهش‌ها می‌توانند با کاهش بیان آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی در سطح گلبول‌های قرمز یا کاهش قدرت آنتی ژنیسیتی آن همراه باشد که تشخیص این آنتی‌ژن‌های کاهش یافته از نظر قدرت آنتی ژنیسیتی به میزان اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌های به‌کار رفته علیه آن‌ها بستگی دارد(۳۷).

بحث

میزان بروز آلوایمیونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز در بیماران مبتلا به هموگلوبینوپاتی‌ها بالاست. این مقدار بالای آلوایمیونیزاسیون به تفاوت‌های آنتی‌ژنی بین‌دهنده خون و گیرنده خون بستگی دارد(۳۸). برنامه‌های زیادی برای کاهش این عارضه در بیماران تالاسمی یا بیمارانی که نیاز به تزریقات خون متعدد دارند طراحی شده است. اما بین موسسات مختلف اتفاق نظر در مورد نحوه انتخاب واحدهای آنتی‌ژن منفی جهت جلوگیری از آلوایمیونیزاسیون وجود ندارد. با این وجود به نظر می‌رسد انجام آزمایشات فنوتایپی جهت تعیین آنتی‌بادی‌های مشکوک ضروری باشد که می‌تواند در شناسایی آنتی‌بادی‌هایی که در آینده در این افراد به وجود آیند موثر باشد(۳۹). روش آگلوتیناسیون بیش از ۱۰۰ سال است که به عنوان روش اصلی تعیین گروه‌های خونی می‌باشد اما در مواردی چون تعیین گروه خونی در بیماران دارای انتقال متعدد به روش آگلوتیناسیون، روش ژنوتایپی (مولکولی) ارجحیت دارد. در حدود یک دهه از معرفی روش‌های مولکولی به بانک خون و طب انتقال خون می‌گذرد. تعیین ژنوتایپ دو سیستم گروه خونی بسیار مهم ABO و Rh به ترتیب به علت شیوع وقوع جهش‌های ضعیف‌کننده بیان آنتی‌ژن‌های زیر گروه‌های A، B و O و پلی‌مورفیسم بسیار بالای ژن‌های Rh، بسیار مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته است(۴۰). امروزه تکنولوژی استفاده از DNA موجب تشخیص مولکولی بسیاری از آنتی‌ژن‌های

1. Hemolytic Disease of newborn
2. Neonatal Allo Immune Trombocytopennia
3. Chorionic Villus Sampling

گروه‌های خونی شده است. بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های گروه‌های خونی به واسطه جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های کد کننده این آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. این دانش موجب تعیین و پیشگویی پروفایل گروه‌های خونی در افراد می‌گردد که می‌تواند موجب غلبه بر مشکلات و محدودیت‌های استفاده از روش‌های آگلوتیناسیون گردد(۴۱-۴۲). از مسائل مهم و سوال برانگیز در این روش این است که آیا استفاده از DNA استخراج شده از گلبول‌های سفید این بیماران که می‌تواند حاوی گلبول‌های سفید موجود در واحدهای خونی نیز باشد، موجب ایجاد اختلاف در نتیجه نهایی می‌گردد؟ مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که حتی استفاده از گلبول‌های سفید افرادی که به تازگی خون دریافت کرده‌اند نیز نتایج کاملا قابل قبولی را ارائه داده‌اند(۴۳،۴۴). یادآوری این نکته ضروری است که در روش‌های آزمایشگاهی مبتنی بر PCR احتمال اشتباه در نتایج، به دلیل آلودگی‌های احتمالی موجود می‌باشد که ممکن است نتایجی غیر از آن چه که در روش آگلوتیناسیون مشاهده می‌شود، به دست آید. به علاوه، تعیین وجود ژنوتایپ خاصی از گروه خونی الزاما به این معنی نیست که این آنتی ژن در سطح گلبول‌های قرمز بروز پیدا کند. با این وجود، تعیین ژنوتایپ گروه‌های خونی انتقال خون را برای بیماران تالاسمی آسان ساخته و اجازه تعیین دقیق و صحیح ژنوتایپ گروه خونی آن‌ها را می‌دهد(۴۵). از آن‌جایی‌که تعیین فنوتایپ گلبول‌های قرمز در بیماران دارای تزریق خون مزمن نمی‌تواند مورد اطمینان باشد، بنابراین استفاده از این روش می‌تواند در تعیین پروفایل آنتی‌ژنی در بیماران مولتی ترانسفیوژن موثر باشد. در همین راستا، نتایج مطالعه انجام شده توسط Castilho و همکارانش که با بررسی ۱۰ بیمار بتاتالاسمی آلوایمیونیزه شده از نظر فنوتایپی به روش آگلوتیناسیون و ژنوتایپی که به روش PCR-RFLP صورت گرفت، نشان داد که در ۹ مورد از ۱۰ مورد، فنوتایپ و ژنوتایپ بیماران متفاوت بوده است. این محققین با توجه به یافته فوق به این نتیجه رسیدند که ژنوتایپینگ گروه‌های خونی موجب ایجاد تسهیلاتی در امر انتقال خون در بیماران بتا تالاسمی و دیگر بیماران دارای تزریقات خون متعدد می‌گردد و پیش‌بینی کردند که در آینده نزدیک، تکنیکی رایج در امر تعیین گروه‌های خونی ارا ئه خواهد شد(۴۶). در مطالعه دیگر انجام شده توسط شایگان و همکاران که به روش PCR-RFLP بر روی ۴۴ بیمار تالاسمی و ۲۰ فرد سالم که سابقه هیچ گونه انتقال خونی نداشتند، نشان داد که بیش‌ترین میزان تفاوت در بین گروه‌های خونی، در گروه خونی Rh دیده شد که با توجه به پلی‌مورفیسم بالای آن، اهمیت بررسی دقیق این گروه خونی را بیش از پیش تاکید می‌کند. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که روش‌های سرولوژیکی در تعیین صحیح گروه‌های خونی افرادی که ترزیقات خونی متعددی دارند روش مناسبی نمی‌باشد و دارای تفاوت‌هایی با روش مولکولی می‌باشد، در حالی که در گروه کنترل که سابقه هیچ‌گونه تزریق خونی نداشتند، نتایج دو روش کاملا یکسان بوده و این کارآمدی روش مولکولی را درمواردی‌که تعیین خون به روش سرولوژیکی انجام می‌شود را ثابت می‌کند. از طرف دیگر، این تحقیق سعی در تبیین روشی کاربردی و ارزان قیمت‌تر نسبت به سایر روش‌های معمول در تعیین مولکولی گروه‌های خونی جهت کاهش عوارض مربوط به انتقال خون در بیماران تالاسمی و دیگر بیماری‌های مشابه داشته است(۴۷). در مطالعه ما نیز نشان داده شد که تعیین زیر گروه‌های گروه Rh به روش سرولوژیکی و به واسطه آنتی‌سرم‌های تجاری و روش مولکولی در بیماران تالاسمی دارای تفاوت های قابل ملاحظه‌ای بودند. در این مطالعه به روش Allele specific PCR و با طراحی پرایمرهای اختصاصی هر SNP در ژن‌های الل‌های فوق‌الذکر، به تکثیر قطعات مورد نظر پرداخته شد. از مزایای این روش این است که در طی یک واکنش قادر به تکثیر قطعات با شرایط دمایی یکسان برای هر الل خواهیم بود و هم در زمان و هم در هزینه

صرفه‌جویی خواهد شـد چـرا کـه یـافتن روش‌هـای کـم هزینـه و آسـان جهـت انجـام ازمایشـات مولکـولی نیـز می‌تواند میزان کاربرد آن را افزایش دهد. جهت رسـیدن به این هدف شناخت کامل خصوصیات ژن هـای هـدف در تبیـین روش مناسـب بـرای آزمایشـات بسـیار مهـم می‌باشد(۴۸).

References

1. Castro O, Sandler SG. Houston-Yup, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. Transfusion 2002; 42(6): 684-690.
2. Richard lee G, Focster G. Wintrobes clinical Hematulogy. 10th ed. Lippingoll Williams & Wilkins; 1999. p. 830-832.
3. Ho HK, Ha SY, Lam Ck, Chan GC, Lee TL, Chiang AK, Lau YL. Alloimmunization in Hong Kong southern Chinese transfusion-dependent thalassemia patients. Blood 2001; 97(12): 3999-4000.
4. Singer ST ,Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. Blood 2000; 96(10): 3369-3373.
5. Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. Vox Sang 1990; 58(1): 50-55.
6. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly Asian descent. Blood 2000; 96(10): 3369-3373.
7. Hiradfar AA, Keikhai B, Pedram M. Determination of Clinical Prevalence and Predominant Pattern of RBCs Alloimmunization Among Transfusion Dependent Thalassemic Patients in Ahvaz. Scientific Medical Journal of Ahwaz University of Medical Sciences 2010; 9(68): 441-448.
8. Ansari SH, Azarkivan A, Salahmand M, Lotfi P. Assessment of Alloimmunization in Multi Transfuse (Thalassemia) Patients Admitted in Ali Asghar Children's Hospital During 2004-05. The Razi Journal of Medical Sciences 2009; 16(62): 65-72.
9. Cheng CK, Lee CK, Lin CK. Clinically significant red blood cell antibodies in chronically transfused patients: a survey of Chinese thalassemia major patients and literature review. Transfusion 2012; 52(10): 2220-2224.
10. Kosaryan M, Mahdavi MR, Roshan P, Hojjati MT. Prevalence of alloimmunisation in patients with beta thalassaemia major. Blood Transfus 2012; 10(3): 396-397.
11. Keikhaei B, Hirad Far A, Abolghasemi H, Mousakhani H, Ghanavat M, Moghadam M, et al. Red Blood Cell Alloimmunization in Patients with Thalassemia Major and Intermediate in Southwest Iran. Iran J Blood Cancer 2013; 6(1): 41-46.
12. Sadeghian MH, Keramati MR, Badiei Z, Ravarian M, Ayatollahi H, Rafatpanah H, et al. Alloimmunization among transfusion-dependent thalassemia patients. Asian J Transfus Sci 2009; 3(2): 95-98.
13. Azarkeivan A, Ansari S, Ahmadi MH, Hajibeigy B, Maghsudlu M, Nasizadeh S, et al. Blood transfusion and alloimmunization

in patients with thalassemia: multicenter study. Pediatr Hematol Oncol 2011; 28(6): 479-485.

14. Rosenfield RE, allen FH Jr, swisher SN, kochwa S. A review of Rh serology and presentation of a new terminology. Transfusion 1962; 2: 287-312.
15. Rosenfield RE, Allen FH Jr, Swisher SN, Kochwa S. Rh nomenclature. Transfusion 1979; 19(4): 487.
16. Ridgwell K, Spurr NK, Laguda B, MacGeoch C, Avent ND, Tanner MJ. Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression. Biochem J 1992; 287(pt 1): 223-228.
17. Hermand P, Mouro I, Huet M, Bloy C, Suyama K, Goldstein J, et al. Immunochemical characterization of rhesus proteins with antibodies raised against synthetic peptides. Blood 1993; 82(2): 669-676.
18. Lee TH, Paglieroni T, Ohto H, Holland PV, Busch MP. Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. Blood 1999; 93(9): 3127-3139.
19. Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron JP, Le Van Kim C. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. Nat Genet 1993; 5(1): 62-65.
20. Le Van Kim C, Mouro I, Brossard Y, Chavinié J, Cartron JP, Colin Y. PCR-based determination of Rhc and RhE status of fetuses at risk of Rhc and RhE haemolytic disease. Br J Haematol 1994; 88(1): 193-195.
21. Tanaka M, Yamashita N, Takahashi J, Hirayama F, Kajii E, Tani Y. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the RHCE gene. Leg Med (Tokyo) 2001; 3(4): 205-212.
22. Faas BH, Simsek S, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HT, von dem Borne AE, et al. Rh E/e genotyping by allele-specific primer amplification. Blood 1995; 85(3): 829-832.
23. Sela M. Antigenicity: some molecular aspects. Science 1969; 166(3911): 1365-1374.
24. Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. Transfusion 1981; 21(1): 64-69.
25. Klein HG, Anstee DJ. The Rh blood group system (and LW). In: Mollison’s blood transfusion in clinical medicine, 11th ed. Oxford, UK: Blackwell Science, Ltd; 2005. p. 163-208.
26. Springer GF, Horton RE, Forbes M. Origin of anti-human blood group B agglutinins in White Leghorn chicks. J Exp Med 1959; 110(2): 221-244
27. Zinkernagel RM. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. Semin Immunol 2000; 12(3): 163-171
28. Albert ML. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation? Nat Rev Immunol 2004; 4(3): 223-231
29. Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, et al. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. J Immunol 2005; 174(3): 1393-1404.
30. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. Blood 2000;

96(10): 3369-3373.

31. Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury RI, Al-Eyaadi O, Al-Bashir A. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. Transfusion 2003; 43(11): 1604-1610.
32. Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? Transfusion 2004; 44(1): 67-72.
33. Reid ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. Curr Opin Hematol 1998; 5(2): 93-102.
34. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. Transfusion 2000; 40(1): 48-53.
35. Storry JR, Westhoff CM, Charles-Pierre D, Rios M, Hue-Roye K, Vege S et al. DNA analysis for donor screening of Dombrock blood group antigens. Immunohematology 2003; 19(3): 73-76.
36. Lo YM. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: implications to noninvasive prenatal fetal blood group genotyping. Transfus Clin Biol 2006; 13(1-2): 50-52.
37. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93(1): 385-393.
38. Blumberg N, Peck K, Ross K, Avila E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. Vox Sang 1983; 44(4): 212-217.
39. Perkins HA. The safety of the blood supply: making decisions in transfusion medicine. In: Nance SJ, (ed). Blood safety: current challenges. Bethesda: American Association of Blood Banks 1992. p. 125-15.
40. Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. Curr Opin Hematol 2006; 13(6): 471-475.
41. Avent ND. Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. Br J Biomed Sci 1997; 54(1): 16-37.
42. Pellegrino J Jr, Castilho L, Rios M, De Souza CA. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. J Clin Lab Anal 2001; 15(1): 8-13.
43. Lee TH, Donegan E, Slichter S, Busch MP. Transient increase in circulating donor leucocytes after allogeneic transfusions in immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. Blood 1995; 85(5): 1207-1214.
44. Lee TH, Donegan E, Slichter S, Busch MP. Transient increase in circulating donor leucocytes after allogeneic transfusions in immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. Blood 1995; 85(5): 1207-1214.
45. Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, et al. Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. Vox Sang 1998; 74(Suppl 2): 29-64.
46. Castilho L, Rios M, Pellegrino J JR, T O Saad S, F Costa1 F. Blood Group Genotyping Facilitates Transfusion of beta-Thalassemia Patients. J Clin Lab Anal 2002; 16(5): 216-220.
47. Shaiegan M, Samiee S, Azarkeivan A, Daneils J, Martin P, Ataiee Z, et al.

Molecular blood genotyping in patients with Thalassemia major in Tehran Adult Thalassemic Clinic. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2009; 6(2): 107-115.
48. Hojjati MT, Einollahi N, Nabatchian F, Pourfathollah AA, Mahdavi MR. Allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction for the determination of Rh C/c and Rh E/e antigens in thalassaemic patients. Blood Transfusion 2011; 9(3): 301-305.