

## همراهی آلل‌های HLA-DRB1 در کودکان ایرانی مبتلا به آرتریت روماتوئید جوانان

شیرین فریور\*، الهام هادی، رضا شیاری

خلاصه

آرتریت ایدیوپاتیک اطفال شایع ترین بیماری روماتیسمی در اطفال می‌باشد و در مناطق مختلف براساس معیارهای مورد بررسی شیوع متفاوتی دارد. در این مطالعه همراهی آلل‌های HLA-DRB1 در ۳۳ کودک ایرانی مبتلا به آرتریت روماتوئید جوانان اولیگوارتیکلر ارزیابی شد. نمونه خون از ۳۳ کودک مبتلا به آرتریت روماتوئید اولیگوارتیکلر جوانان و ۴۵ فرد سالم (بعنوان گروه کنترل) تهیه و از نظر همراهی آلل‌های HLA-DRB1 با هم مقایسه شدند. بررسی HLA بر پایه PCR و با تکنیک PCR-SSP انجام گرفت، همچنین ساب تایپ‌های HLA-DRB1 در گروه بیمار با توالی یابی آگزون دو تعیین گردید. بیشترین همراهی با بیماری JRA در HLA-DRB1\*08 یافت شد. از نظر فراوانی، HLA-DRB1\*11 فراوان ترین آلل در بیماران بود که اختلاف چشمگیری را با گروه کنترل نشان دادند. HLA-DRB1\*04 که در سایر جوامع بعنوان آلل محافظت‌کننده معرفی شده، در این مطالعه تفاوتی را بین دو گروه بیمار و گروه کنترل نشان نداد.

تفاوت چشمگیری در فراوانی آللی بین بیماران و گروه کنترل وجود دارد که این تفاوت می‌تواند در بررسی و پیش‌بینی استعداد ابتلا آرتریت روماتوئید اولیگوارتیکلر جوانان در جمعیت ایرانی کمک‌کننده باشد.  
کلمات کلیدی: HLA-DRB1؛ آرتریت روماتوئید جوانان؛ اولیگوارتریت؛ فاکتور روماتوئید

مقدمه

از ۱۶ سالگی، وبا رد سایر علل آرتریت تشخیص داده می‌شود. شیوع این بیماری در مناطق مختلف متفاوت بوده ولی بروز آن ۱۵۰-۸ مورد به ازای ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال گزارش شده است (۲). آرتریت روماتوئید الیگوارتیکلر جوانان (OA-JRA) براساس تقسیم بندی اتحادیه بین المللی روماتولوژی ILAR، یکی از زیرنوع‌های آرتریت ایدیوپاتیک اطفال می‌باشد که در دخترها بیش تر از پسرها دیده می‌شود. زیرنوع‌های مختلف

آرتریت روماتوئید جوانان<sup>۱</sup> (JRA) یک بیماری التهابی مزمن با علت ناشناخته است. این بیماری شایع ترین بیماری روماتیسمی کودکان محسوب می‌گردد (۱). تشخیص JRA بر اساس معیارهای تشخیصی اتحادیه بین المللی روماتولوژی (ILAR)<sup>۲</sup> بوده که مطابق با آن آرتریت (التهاب مفصل) برای مدت حداقل ۶ هفته، شروع بیماری قبل

1. Juvenile Rheumatoid Arthritis  
2. International League of Associations for Rheumatology  
3. Oligoarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis

\* شیرین فریور، PhD

دکترای ژنتیک، استادیار دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی  
تلفن: ۰۲۱-۲۹۹۰۲۷۳۳  
تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱۰

از ژن بتا اکتین بعنوان کنترل مثبت واکنش PCR در تمام واکنش‌ها استفاده شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگاروز ۲٫۵٪ الکتروفورز شد و زیر نور UV جهت مشاهده باندهای اختصاصی مشاهده گردید.

### تحلیل آماری

جهت بررسی تفاوت فراوانی‌های اللی بیماران و گروه کنترل از برنامه SPSS و تست Chi-Square استفاده شد. همراهی بین ال‌های مختلف HLA-DRB1 و بیماری با تعیین Odds Ratio و فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪ محاسبه گردید.

### نتایج

از ۳۳ کودک در سنین ۳ تا ۱۲ سال مبتلا به OA-JIA، ۲۰ کودک دختر و ۱۳ کودک پسر بودند. فاکتور روماتیسمی (RF) در تمام کودکان منفی و ANA در ۱۲ کودک (۳۶/۳۶٪) مثبت بود. فراوان ترین ال در گروه بیمار و کنترل: ۳۳٫۳٪ vs ۵۶٫۲۵٪ HLA-DRB1\*11 ( $p < 0.002$ ,  $X^2 = 9.821$ ) بود و بیشترین همراهی با بیماری را HLA-DRB1\*08 (۶٫۷٪ vs ۲۸٫۱۲۵٪;  $p < 0.000$ ,  $X^2 = 14.174$ ) داد. در این ۳۳ بیمار، HLA-DRB1\*04 تفاوت چشمگیری را بین دو گروه (۱۱، ۱۱) vs (۱۳، ۳۳) نشان نداد. نتایج این بررسی در جدول ۳ خلاصه شده است.

### بحث

آرتريت آیدیوپاتیك کودکان و نوجوانان (JIA)، شایع ترین بیماری روماتیسمی در کودکان محسوب میگردد که براساس منطقه و نژاد مورد بررسی شیوع و بروز متفاوتی دارد. متأسفانه در خصوص شیوع این بیماری در ایران تاکنون آماری گزارش نگردیده ولی بیشترین شیوع آن را در نروژ و استرالیا در حدود ۱۴-۲۳ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش نموده‌اند (۱۰). یافته‌های جدید در مورد JIA پیشنهاد می‌کنند که استعداد ژنتیکی همراه با فاکتورهای محیطی در بروز JIA بعنوان یک بیماری پیچیده ژنتیکی دخیل می‌باشد. حضور ال‌های مختلف HLA کلاس یک و دو همراه با افزایش خطر بروز JIA در جوامع مختلف بررسی و ثابت شده است و شواهد قوی برای وجود همراهی بین لوکوس DRB1 و JIA وجود دارد (۱۱ و ۵). همچنین، همراهی ال‌های مختلفی در هر جمعیت با بیماری گزارش شده است بطوریکه در اروپا ال‌های ۱۳، ۱۱، ۰۸، ۰۳، ۰۱ DRB1 بیشترین همراهی با بیماری را داشته‌اند و در جمعیت عرب همراهی ال‌های ۰۸ DRB1 و

JIA از لحاظ تظاهرات بالینی، پیش آگهی، تظاهرات خاص خود ایمنی و تمایزات ژنتیکی متفاوت‌اند (۳) OA-JIA در بیماران دچار آرتريت کمتر از ۵ مفصل در طی ۶ ماه اول بیماری تشخیص داده می‌شود (۳ و ۲). یافته‌های جدید در مورد JIA پیشنهاد می‌کنند که استعداد ژنتیکی همراه با فاکتورهای محیطی در بروز JIA بعنوان یک بیماری پیچیده ژنتیکی دخیل می‌باشد (۴). حضور ال‌های مختلف HLA کلاس یک و دو همراه با افزایش خطر بروز JIA در جوامع مختلف بررسی و ثابت شده است (۵ و ۳)، در بین ال‌های مختلف HLA-DRB1 بیشترین همراهی بیماری با ال‌های ۱۳، ۱۱، ۰۸، ۰۱ HLA-DRB1 دیده شده و ال‌های دیگری ۰۷، ۰۴ HLA-DRB1 به عنوان محافظت کننده در برابر بیماری مطرح شده‌اند (۸-۶). در خصوص شیوع و همراهی HLA-DRB1 در کودکان ایرانی تاکنون مطالعه ای انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی همراهی HLA-DRB1 در کودکان مبتلا به OA-JIA می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۳۳ کودک مبتلا به OA-JIA و ۴۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. گروه بیمار شامل ۲۰ کودک دختر و ۱۳ کودک پسر در سنین ۳ تا ۱۲ سال بودند که به درمانگاه فوق تخصصی روماتولوژی کودکان واقع در بیمارستان تخصصی کودکان مفید مراجعه نموده بودند. تشخیص بیماری بر اساس معاینه فیزیکی و کرایتریای تشخیصی اتحادیه بین المللی روماتولوژی (ILAR) داده شد. در طی مشاوره، والدین این کودکان بطور آگاهانه در جریان تحقیق قرار گرفته و رضایت خود را به صورت کتبی جهت شرکت در مطالعه اعلام نمودند. در گروه کنترل ۴۵ فرد سالم، بدون سابقه بیماری ژنتیکی و بیماری خودایمن پس از کسب رضایت آگاهانه در مطالعه شرکت نمودند. گروه بیمار و شاهد از نظر سنی و جنسی با هم همگون بودند. DNA ژنومی از نمونه‌های خون بیماران و افراد کنترل با استفاده از کیت استخراج کپازن استخراج شد. تعیین نوع HLA-DRB1 با تکنیک PCR-SSP و با روش Zetterquist و Olerup انجام گرفت (۹). در همین راستا ۴ پرایمر طراحی شد (جدول ۱)، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر روی ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر برای ۳۵ چرخه ۹۴°C برای یک دقیقه، ۶۰°C برای یک دقیقه و ۷۲°C برای دو دقیقه جهت تکثیر اگزون دو HLA-DRB1 با پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (جدول ۲). یک جفت پرایمر نیز برای تکثیر قطعه محدودی

HLA-DRB1\*03 گزارش شده است (۱۳ و ۱۲ و ۱۰). در تایوان نیز گزارشی از همراهی ال‌های DRB1\*08 و DRB1\*04 با الیگواتیکولار آرتريت آیدیوپاتیک جوانان وجود دارد (۱۵).

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران انجام می‌گیرد، HLA-DRB1\*08 بیشترین همراهی را با بیماری آرتريت روماتوئید نوع اولیگواتیکولر کودکان و نوجوانان را در ایران نشان می‌دهد که با توجه به آنالیز آماری (6.7% vs. 28.125%) توصیه می‌گردد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران انجام می‌گیرد، HLA-DRB1\*08 بیشترین همراهی را با بیماری آرتريت روماتوئید نوع اولیگواتیکولر کودکان و نوجوانان را در ایران نشان می‌دهد که با توجه به آنالیز آماری (6.7% vs. 28.125%) توصیه می‌گردد.

**Table-1: Table 1. The sequences of Primer pair for Positive control and PCR products:**

Positive control	Products (bps)	Forward	Reverse
Beta Actin	354	CACTCTTCGAGCCTTCCTTC	AGTCCGCCTAGAAGCATTTG

**Table-2: The sequences of specific primer pairs and PCR products for HLA-DRB1 typing**

Group	HLA-DRB1 alleles	Products (bps)	Forward	Reverse
1	HLA-DRB1*04	263	GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT
2	HLA-DRB1*08	254	AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT
3	HLA-DRB1*11	179	ACGTTTCTTGGAGTACTCTACG	CTGGCTGTTCCAGTACTCTCT

**Table-3: Frequency of HLA-DRB1 alleles in Iranian Patients with OA-JIA and Controls**

Alleles	Controls (45)		Patients (33)		P value	OR ( 95% CI )
	N	Frequency	N	Frequency		
DRB1*04	5	11.1	4	12.1	NS	1.103 (0.462-2.632)
DRB1*08	3	6.7	9	27.3	0.000	4.914 (2.026-11.918)
DRB1*11	15	33.3	18	54.5	0.002	2.481 (1.398-4.404)

## References

- Cate BA. Juvenile arthritis-who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence. Clin Exp Rheumatol 1999;17:367-74.
- Petty RE, Southwood TR, Baun J,. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis. Durban J Rheumatol 1997;25:1991-4
- Thomson W, Barret JH, Donn R, Pepper L, Kennedy J, Ollier W.E.R, Solman A.J.S, and et al. Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA association in UK patient. Rheuma 2004;41:1183-9.
- Moraldo M, Tague BL, Glass DN, Giannini EH. juvenile rheumatoid arthritis in affected sib-pairs. Arthritis Rheum 1999;40:1962-1966
- Gravito G, Yunis EJ, Egea E et al. HLA-DRB1 alleles and HLA-DRB1 shared epitopes are markers for juvenile rheumatoid arthritis

- subgroups in clombian mestizos. *J Hum Immunol* 2004;65(4):359-65.
6. Nepom BS. The immunogenetics of juvenile rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin north Am* 1991;17:825-842
7. Glass DN, Gianini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *juvenile rheumatoid arthritis* 1999;42:2261-8
8. Hass JP, Neviny-Stickel C, Schoenwald U, Truckenbrodt H et al. Susceptible and protective major histocompatibility complex class II alleles in early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Human Immunol* 1994;4:225-233
9. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35
10. Forre O, Smerdel A. Genetic epidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 2002;31:123-128
11. Savolainen A, Saila H, Kotaniemi K, Kaipianen-Seppanen O, Leirisalo-Repo M, Aho K. Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:1001-8.
12. Donn R, Alourfi Z, Zeggini E, et al. British Paediatric Rheumatology Study Group. A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(5):1604-10.
13. Alsaïd K, Haider MZ, Sharma PN, et al. The prevalence of human leukocyte antigen (HLA) DR/DQ/DP alleles in Kuwaiti children with oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2006;26:224-228.
14. Kurahara D, Takuda A, Grandinetti A et al. Ethnic differences in risk for pediatric rheumatic illness in a culturally diverse population. *J Rheumatol* 2002;29:379-383.
15. Huang J. L, Yeh C. C, Shaw C. K, Yao T. C, Chen L. C, Lee T. D, Kuos M. L. HLA-DRB1 genotyping in patients with juvenile idiopathic arthritis in Taiwan. *Europ J Immu* 2004;31:185-8.