مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز و زمستان ۱۳۸۰؛ دوره ۱ (شماره ۱):۴۱-۵۱

مقاله پژوهشی

پیوستگی و ارتباط کمپلکس ژنهای HLA با بیماری دیابت قندی نوع ۱ در ۸۱ خانواده: پیوستگی شدید ژن $DRB1^{Lys71+}$ با دیابت نوع ۱

مهدی زمانی* : استادیار، بخش ژنتیک پزشکی مرکز طبی کودکان, گروه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
جان نیروپ: پروفسور، مرکز مطالعات دیابت, دانمارک
ژانژاک کاسیمان: پروفسور، مرکز ژنتیک انسانی, دانشگاه لوون بلژیک

چکیده

مقدمه: مطالعات و تحقیقات زیادی نشان داده است که دیابت نوع۱ با چندشکلی ژنهای ناحیهHLA روی کروموزوم۶ (6P21) ارتباط دارد. اخیراً نتایج تحقیقات شاهددار در جمعیت بلژیک در سطح DNA نشان داد که بین دیابت نوع ۱ و بعضی ژنهای HLA کلاسII بهویژه $DRB1^{Lys71+}$ ارتباط معنیداری از نظر اماری وجود دارد.
روشها: هشتاد و یک خانواده دانمارکی (با حداقل دو فرد مبتلا در هر خانواده) و ۸۲ فرد سالم بهعنوان شاهد برای چندشکلی ژنهای HLA-DRB و۵۴ خانواده از ۸۱ خانواده برای چندشکلی ژنهایHLA-B,DQA1,DQB1-HLA-B و ژنهای TNFA وTNFB مطالعه شدند. پیوستگی بین دیابت نوع ۱ با اللهای ژنDRB1 که +Lys71 را رمزدهی میکند با آنالیز خواهر برادرهای مبتلای هر خانواده (affected sib pair analysis) مطالعه شد.
یافتهها: در جمعیت مورد بررسی، ژن هوموزیگوت $DRB1^{Lys71+}$ دارای خطر نسبی(RR) ۱۰۳/۵ و پیوستگی بین دیابت نوع ۱ با اللهای ژن $DRB1^{Lys71+}$ فوقالعاده قوی ($p<1\times10^{-6}$) بود. مطالعه مبتنی بر خانواده (family based association study) ارتباط ژن با بیماری نشان داد که$DRB1^{Lys71+}$ مهمترین ژن در ناحیه HLA میباشد که فرد را برای ابتلا به بیماری دیابت نوع ۱ مستعد میسازد (haplotype relative risk =۸/۳۸). آنالیز هاپلوتیپ این یافته را تایید کرد.
نتیجهگیری: به نظر میآید که $DRB1^{Lys71+}$ ژن اصلی مستعدکننده برای دیابت نوع ۱ باشد.

کلیدواژهها: پیوستگی ژنی، دیابت نوع ۱، چندشکلی HLA، مطالعات خانوادهها، خطر نسبی هاپلوتیپ

مقدمه

بیماری دیابت قندی نوع ۱ (وابسته به انسولین) در اثر تخریب سلولهای بتای پانکراس توسط دستگاه ایمنی خود فرد ایجاد میشود و باعث میگردد که بیمار برای زنده ماندن انسولین تزریق کند. عوامل ایجادکننده دیابت نوع ۱ پیچیدهاند و هر دو عامل ژنتیک و محیط در ایجاد آن دخیل هستند. گروهی از ژنها گزارش شده است که در بروز دیابت نوع ۱ نقش دارند. از بین آنها ژنهای HLA کلاس II واقع در روی کروموزوم۶ (6p21) از همه مهمتر هستند و به عنوان لوکوسهای عمده برای مستعد کردن فرد به دیابت نوع۱ مطرح شدهاند (۱-۱۰).

* نشانی: تهران انتهای بلوار کشاورز، خیابان دکتر قریب، مرکز طبی کودکان، بخش ژنتیک پزشکی

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات نشان داده است که لوکوس‌های *DQ* و *DR* در مستعد کردن ومحافظت فرد در مقابل دیابت نوع ۱ سهم دارند به‌ویژه الل‌های *DRB1*0401*، *DQB1*0302* ، $DQA1^{Arg52+}$ و $DQB1^{Asp57-}$ به‌عنوان ژنهای مستعدکننده و الل‌های *DRB1*1500* ، *DRB1*0701* ، $DQA1^{Arg52-}$ و $DQB1^{Asp57+}$ به‌عنوان ژنهای مقاوم به بیماری شناخته شده اند (۱۱–۱۸، ۲۲، ۲۳). در مطالعه قبلی , ما ژن $DRB1^{Lys71+}$ را به‌عنوان اصلی‌ترین ژن مستعدکننده دیابت نوع ۱ در جمعیت بلژیک پیدا نمودیم (۱۹) در حالی که $DQB1^{Asp57}$ فقط یک اثر افزاینده خطر برروی $DRB1^{Lys71+}$ داشت و خطری که ژنوتیپ $DQA1^{Arg52++}$ برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند قابل‌توجیه با حضور ژن $DRB1^{Lys71+}$ در این بیماران می باشد زیرا از میان ۲۰۰ بیمار دیابت نوع ۱ مطالعه شده بلژیکی, آن بیمارانی که دارای ژنوتیپ $DQA1^{Arg52++}$ بودند، لیزین را در موقعیت ۷۱ مولکول زنجیرهٔ *DRB1* حمل می‌کردند یا به عبارت دیگر دارای الل $DRB1^{Lys71+}$ بودند. براساس ساختمان سه‌بعدی مولکول هترودیمر *HLA-DR1αβ*, اسید آمینه لیزین در موقعیت ۷۱ (محل پیوستن آنتی‌ژن به مولکول HLA) قرار گرفته است (۲۰) و بنابراین می‌تواند نقش مهمی در پیوستن آنتی‌ژن به HLA بازی کند. برای ۱) تأیید نتایج حاصل از مطالعه جمعیت بلژیک در یک جمعیت دیگر، ۲) تعیین اینکه کدام لوکوس در ناحیه HLA در مطالعهٔ خانوادگی پیوستگی قوی با دیابت نوع ۱ دارد و ۳) در لوکوس‌های پیوسته کدام الل بالاترین خطر را ایجاد می‌کند، ۸۱ خانواده دیابت نوع ۱ و۸۲ شاهد سالم برای ژنهای *HLA* کلاس *DQB1 II* ، *DQA1* و *DRB1* و کلاس *HLA-B I* و کلاس *HLA-TNFA III* و*TNFB* در سطح *DNA* مطالعه شدند. نتایج حاصل پیوستگی شدید دیابت نوع ۱ با لوکوس*DRB1* را نشان داد به‌گونه‌ای که الل‌های رمزدهنده Lys^{71+} بالاترین خطر هاپلوتیپی را (*HRR*=۸/۳۸) برای دیابت نوع ۱ از میان الل‌های مطالعه‌شده ژنهای مختلف در ناحیه *HLA* ایجاد کردند.

روشها

بیماران

هشتاد و دو خانواده (۳۸۸ نفر) مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر خانواده حداقل دو نفر مبتلا وجود داشت و همه خانواده‌ها دانمارکی بودند و نسبتی با همدیگر نداشتند. بیماران مورد مطالعه برپایهٔ معیارهای سازمان جهانی سلامت (WHO) برای دیابت نوع ۱ تشخیص داده شده‌اند.

برای مطالعه ارتباط و پیوستگی بیماری با ژنهای DRB به‌ترتیب ۸۲ بیمار (یک بیمار از هرخانواده) و ۸۲ خانواده (همه مبتلایان و غیرمبتلایان هر خانواده) مطالعه شدند. در کل ۳۸۲ فرد که ۱۷۳نفرآنها مبتلا به دیابت نوع ۱ و بقیه سالم بودند برای ژنهای DRB مورد مطالعه قرار گرفتند. برای سایر ژنها ۵۴ خانواده مطالعه شد. همچنین ۸۲ نفر از جمعیت دانمارکی به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند که افرادی سالم و بدون سابقه بیماری در خانواده بودند.

تعیین ژنوتیپ

ژنوتیپ ۸۱ خانواده و۸۲ شاهد برای ژنهای HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 با روش PCR-SSOs مشخص شد. به‌طور خلاصه در این روش ابتدا اگزون دوم ژنهای DRB که به‌شدت چندشکلی است و همه الل‌ها از روی آن قابل‌شناسایی می‌باشند, با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد و محصولات PCR در طول عمل تکثیر با بیوتین فلورسانت نشاندار شدند . محصولات PCR در دمای مشخصی با نوکلئوتیدهای اختصاصی برای توالی‌های

Archive of SID

www.SID.ir

(sequences) چندشکلی (SSOs) هیبرید شدند و هیبریدهای مثبت با روش غیررادیواکتیو کالورومتریک مشخص و شناسایی شد. با تفسیر هیبریدهای مثبت و منفی، ژنوتیپ هر فرد برای ژن مربوط مشخص گردید. ژنوتیپ ۵۲ خانواده از ۸۱ خانواده برای ژنهای HLA-B DQA1,DQB1 ,TNFB ,TNFA تعیین شد. برای تعیین ژنوتیپ TNFA از چندشکلی‌های میکروساتلیت استفاده شد و روش کار طبق آنچه که Jongeneel توضیح داده است (۲۱) و به‌صورت غیررادیواکتیو مشخص گردید. ژن TNFB با برش آنزیمی NCOI در اولین انترون ژن با روش PCR-RFLP آنالیز گردید(۶). HLA-B به روش فلورسانت آن طوری که پوسیوت و همکارانشان (۶) توضیح داده‌اند مشخص گردید. در نهایت ژنهای HLA-DQA1, DQB1 مانند ژنهای HLA-DRB و HLA-DRB تعیین ژنوتیپ شدند.

آنالیز اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه که از نظر ساختمان سه‌بعدی براون (۲۰) در ناحیه پیوستن آنتی ژن قرار دارند از روی توالی نوکلئوتیدهای هر الل مربوطه (۲۴) تعیین گردیدند .

تحلیل آماری

تعیین خطر نسبی

خطر نسبی (RR) با روش Wolf حساب شد (۲۵) و میزان معنی‌دار بودن فراوانی هر الل یا ژنوتیپ با روش فیشر معین شد (۲۶) و ارزش p برای آزمونهای چندگانه اصلاح گردید (ارزش p حاصل به تعداد الل‌های هر ژن ضرب می‌شود) (۲۷–۲۸) (جدول ۱).

آنالیز جفت فرزندان مبتلا

آنالیز پیوستگی در جفت فرزندان مبتلا با برنامه رایانه‌ای ESPA انجام گرفت (۲۹–۳۰). در این روش پیوستگی بین بیماری و ژن در جفت فرزندان مبتلا که در صفر, یک یا دو الل شریک هستند، به ترتیب با فراوانی‌های مورد انتظار۲۵, ۵۰, ۲۵ درصد مقایسه می‌شوند و این مقدارهای مقایسه‌شده باید در حالت معمولی تقریباً مطابقت کنند. اگر از لحاظ آماری این مقدار به‌طور معنی‌دار به نفع الل‌های مشترک بالا رود، بدین معنی است که پیوستگی بین ژن و بیماری وجود دارد.

آنالیز خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR[1])

برای تعیین میزان این خطر, ژنوتیپ فرزندان و والدین هر خانواده برای ژن مورد نظر مشخص می‌گردد و الل‌های بیماری, الل‌هایی هستند که از والدین به فرزندان مبتلا منتقل شده‌اند و الل‌های شاهد الل‌هایی هستند که به فرزندان بیمار منتقل نشده‌اند (۳۱، ۳۲، ۳۳). اندازه‌گیری HRR با سنجش خطر نسبی (RR) متفاوت است. اساس HRR مبتنی بر تعداد الل‌های منتقل‌شده و منتقل‌نشده به فرزند (اولین فرزند مبتلا) است , در حالی‌که RR مبتنی بر تعداد الل‌های بیمار و شاهد می‌باشد. در آنالیز هاپلوتیپ‌ها به جای الل‌ها, هاپلوتیپ‌های منتقل‌شده و منتقل‌نشده به فرزندان مبتلا بررسی می‌شود.

تأیید پیوستگی DRB1

در مطالعات حاضر در جمعیت دانمارکی تقریباً همان الل‌های مستعدکننده و محافظ به‌دست آمد که ما در مطالعه قبلی در جمعیت بلژیکی پیدا کرده بودیم، بجز الل DRB3*0101 که فقط در جمعیت دانمارک با بیماری دیابت نوع ۱ ارتباط داشت (جدول ۲). خطر

[1] Haplotype relative risk

Archive of SID

www.SID.ir

نسبی (RR) برای DRB1*0101 در جمعیت دانمارکی داشت ولی این خطر نسبی برای DRB1*0301 (RR=۱۲/۸) نسبت به بلژیکی‌ها (RR=۵) افزایش

جدول ۱ـ توزیع آلل‌های DRB در بیماران دیابت نوع ۱ دانمارکی و شاهدهای سالم

اللها	دیابت نوع ۱ (تعداد=۱۶۴)		شاهدها (تعداد=۱۶۴)		P*	خطرنسبی† (حدود اطمینان ۹۵٪)
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
DRB1						
۰۱۰۱	۸	۰/۰۴۹	۱۶	۰/۰۹۸	ns	
۰۱۰۳	۰	۰,۰۰۰	۱	۰/۰۰۶		
۰۳۰۱	۵۴	۰/۳۳۰	۱۵	۰/۰۹۲	$۱/۴\times۱۰^{-۶}$	۴/۸۸(۲/۶–۸/۷)
۰۴۰۰	۴	۰/۰۲۵	۱۵	۰/۰۹۲		
۰۴۰۱	۷۰	۰/۴۲۷	۹	۰/۰۵۵	$<۱۰^{-۸}$	۱۲/۸۳(۶/۱–۲۴/۸)
۰۷۰۱	۳	۰/۰۱۸	۲۶	۰/۱۵۹	۶×۱۰^{-۵}	۰/۱(۰/۰۴–۰/۳۳)
۰۸۰۱	۳	۰/۰۱۸	۲	۰/۰۱۲		
۰۸۰۲	۰	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۶		
۰۸۰۴	۰	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۶		
۰۹۰۱	۱	۰/۰۰۶	۰	۰/۰۰		
۱۱۰۱	۲	۰/۰۱۲	۱۲	۰/۰۷۳	ns	
۱۱۰۳	۱	۰/۰۰۶	۲	۰/۰۱۲		
۱۲۰۱	۲	۰/۰۱۲	۴	۰/۰۲۴		
۱۳۰۱	۱	۰/۰۰۶	۱۲	۰/۰۷۳	۰/۰۲	۰/۰۸(۰/۰۲–۰/۵)
۱۳۰۲	۱۲	۰/۰۷۳	۱۴	۰/۰۸۵		
۱۳۰۳	۰	۰/۰۰۰	۲	۰/۰۱۲		
۱۴۰۱	۰	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۶		
۱۵۰۰	۱	۰/۰۰۶	۳۰	۰/۱۸۳	$<۱۰^{-۸}$	۰/۰۳(۰/۰۱–۰/۱۷)
۱۶۰۰	۲	۰/۰۱۲	۱	۰/۰۰۶		
DRB3						
۰۱۰۱	۴۴	۰/۲۶۸	۲۳	۰/۱۴۰	۰/۰۱۰	۲/۲۷(۱/۳–۳/۹)
۰۲۰۱	۱۶	۰/۰۹۸	۲۶	۰/۱۵۹	ns	
۰۳۰۱	۱۴	۰/۰۸۵	۱۵	۰/۰۹۱		
–	۹۰	۰/۵۴۹	۱۰۰	۰/۶۱۰		
DRB4						
۰۱۰۱	۷۸	۰/۴۷۶	۴۹	۰/۲۹۹	۰/۰۰۱۴	۲/۱۳(۱/۳۵–۳/۳)
–	۸۶	۰/۵۲۴	۱۱۵	۰/۷۰۱	۰/۰۰۱۷	۰/۴۷(۰/۳۰–۰/۷۴)
DRB5						
۰۱۰۱	۱	۰/۰۰۶	۲۸	۰/۱۷۱	۸×۱۰^{-۸}	۰/۰۳(۰/۰۱–۰/۱۹)
۰۱۰۲	۰	۰,۰۰	۱	۰/۰۰۶		
۰۲۰۱	۲	۰/۰۱۲	۱	۰/۰۰۶		
–	۱۶۱	۰/۹۸۲	۱۳۴	۰/۸۱۷	۸×۱۰^{-۸}	۱۲(۳/۶–۳۰/۴)

این اللها در هیچیک از دو گروه دیابتی‌های غیروابسته به انسولین یا شاهد دیده نشد: ۰۱۰۲، ۰۳۰۲، ۰۴۰۶، ۰۴۰۹، ۰۴۱۰، ۰۴۱۱، ۰۴۱۲، ۰۸۰۳، ۰۸۰۵، ۱۰۰۱، ۱۱۰۴، ۱۱۰۵، ۱۱۰۶، ۱۲۰۲، ۱۳۰۴، ۱۳۰۵، ۱۴۰۲، ۱۴۰۳، ۱۴۰۴، ۱۴۰۵، ۱۴۰۶، ۱۴۰۷، ۱۴۰۸.

گروه ۰۴۰۰ *DRB1 شامل تمام اللهای ۰۴ *DRB1 بجز ۰۴۰۱ *DRB1 می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

گروه‌های ۱۱۰۱ *DRB1 و ۱۳۰۱ *DRB1 به ترتیب شامل الل‌های ۱۱۰۲، ۱۱۰۱ *DRB1 و ۱۳۰۵، ۱۳۰۱ *DRB1 می‌باشند.
* p value بر اساس آزمون دقیق فیشر
Relative risk†
ns: non significant

جدول ۲ـ نقش $DRB1^{Lys71+}$ در افزایش خطر نسبی در بیماران دیابت نوع ۱ دانمارکی

اللها	دیابت نوع ۱ (تعداد=۱۶۴)		شاهدها (تعداد=۱۶۴)		p*	خطرنسبی† (حدود اطمینان ۹۵٪)
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
$DRB1^{Lys71+}$	۱۲۴	۰/۷۵۶	۲۶	۰/۱۵۹	$<10^{-8}$	۱۷/۳(۹/۸–۲۹)
$DRB1^{Lys71-}$	۴۰	۰/۲۴۴	۱۳۸	۰/۸۴۱	$<10^{-8}$	۰/۰۶(۰/۰۴–۰/۱۱)
ژنوتیپ‌ها	(تعداد =۸۲)		(تعداد = ۸۲)			
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
$DRB1^{Lys71+/+}$	۴۶	۰/۵۶۱	۱	۰/۰۱۲	$<10^{-8}$	۱۰۳/۵(۱۶–۳۰۰)
$DRB1^{Lys71-/-}$	۴	۰/۰۴۹	۵۷	۰/۶۹۵	$<10^{-8}$	۰/۰۲(۰/۰۱–۰/۰۷)
$DRB1^{Lys71+/-}$	۳۲	۰/۳۹۰	۲۴	۰/۲۹۳	ns	–

* p value براساس آزمون دقیق فیشر با تصحیح برای مقایسه‌های چندتایی
Relative risk †

در هر دو جمعیت تقریباً یکسان بود. توان حفاظتی الل DRB1*0701 نیز در جمعیت دانمارکی بالاتر بود. وقتی که وجود یا نبود الل‌های خاصی را بررسی نمودیم, دریافتیم که ژن $DRB1^{Lys71+}$ بالاترین خطر را برای بیماری دیابت نوع ۱ پدید می‌آورد ($p<10^{-8}$، RR=۱۷/۳). این خطر در جمعیت دانمارکی حتی بیشتر از جمعیت بلژیکی بود. میزان خطر برای پیدایش دیابت نوع ۱ در افراد هوموزیگوت $DRB1^{Lys71++}$ خیلی بیشتر از افراد هتروزیگوت بود (RR=۱۰۳/۵). به‌طور کلی ۵۶/۱٪ بیماران دیابت نوع ۱ دارای ژنوتیپ $DRB1^{Lys71++}$ بودند درحالی‌که ۱/۲٪ افراد گروه شاهد، این ژنوتیپ را داشتند.

بررسی جفت فرزندان مبتلا

نتایج بررسی با روش ESPA در ۸۱ خانواده برای ژن DRB در جدول ۳ خلاصه شده است . در کل ۹۱جفت فرزند مبتلا (۱۸۲مبتلا) مطالعه شدند که ۱۴۹ مورد از ترکیب والدین و جفت فرزندان مبتلا گویا بود و ۳۳ مورد بخاطر هوموزیگوت بودن والدین گویا نبود. در ۷۰/۶٪ از موارد گویا, وجود الل مشترک مشاهده شد که به‌طور واضح از درصد مورد انتظار (یعنی ۵۰٪) منحرف شده بود و این تغییر از لحاظ آماری خیلی معنی‌دار بود ($p<1\times10^{-6}$). خلاصه نتایج حاصل از مطالعه ژنهای HLA-B،TNFB،TNFA،DQB1،DQA1 در جدول ۳ آورده شده است و نتایج پیوستگی ژنهای HLA را با دیابت نوع ۱ نشان می‌دهد.

الل‌هایی که برای دیابت نوع ۱ پرخطر به‌شمار می‌آیند

خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای الل‌های ژنهای HLA-B،TNFA,TNFB،DQB1،DQA1 HLA DRB1 محاسبه شد که به‌طور معنی‌دار با دیابت نوع ۱ ارتباط داشتند (جدول‌های ۴، ۵، ۶). برخلاف پیوستگی ژنی

Archive of SID

www.SID.ir

بین TNFA و دیابت نوع ۱, محاسبه HRR نشان داد که فقط الل ۲ ارتباط معنی‌دار ضعیفی با دیابت نوع ۱ دارد (HRR=۲/۱۸، p=۰/۰۳۲) و برای TNFB الل ۵/۵ با دیابت نوع ۱ ارتباط داشت (HRR=۱/۹۱، p=۰/۰۲۷).

برای ژن HLA-B فراوانی الل‌های شماره ۱۵و ۷ در بیماران به‌ترتیب افزایش و کاهش نشان دادند (داده‌ها نشان داده نشده) ولی معنی‌دار نبود . در

جدول ۳ـ پردازش Sib-paris برای جایگاه‌های مختلف در خانواده‌های دیابت نوع ۱

	غیرمشترک (٪)	مشترک (٪)	نامشخص	p مجموع
در ۸۱ خانواده IDDM				
	۴۴(۲۹/۴)	۱۰۵/۸(۷۰/۶)	۳۲/۲	$<۱\times۱۰^{-۶}$
در ۵۴ خانواده IDDM				
DRB1	۳۲(۳۱/۷)	۶۹(۶۸/۳)	۲۳	<۰/۰۰۰۱۱
TNFA	۲۶(۲۸)	۶۷(۷۲)	۳۱	<۰/۰۰۰۱۱
TNFB	۱۶(۳۱/۴)	۳۵(۶۸/۶)	۷۳	<۰/۰۰۰۳۹
HLA-B	۲۶(۲۸/۹)	۶۴(۷۱/۱)	۱۸	<۰/۰۰۰۰۳۲
DQA1	۳۰(۳۰)	۷۰(۷۰)	۲۴	<۰/۰۰۰۰۳۲
DQB1	۳۲(۳۳)	۶۵(۶۷)	۲۷	<۰۰۰۴۰
Haplo	۳۴(۳۰/۹)	۷۶(۶۹/۱)	۱۴	<۰/۰۰۰۰۳۲

جدول ۴ـ خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای الل‌های TNFA، TNFB، HLA-DQA1، DQB1 و ۰۴۰۱ *DRB1 با ارتباط معنی‌دار در خانواده‌های دیابت نوع ۱ دانمارکی

اللها	اللهای منتقل شده دیابت نوع ۱		اللهای منتقل نشده شاهدها		p	خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
TNFA	(تعداد = ۱۰۶)		(تعداد = ۱۰۶)			
۲	۵۴	۰/۵۰۹	۳۴	۰/۳۲۱	۰/۰۳۲	۲/۱۸(۱/۲۵–۳/۷۴)
TNFB	(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)			
۱۰/۵	۵۳	۰/۴۹۱	۷۰	۰/۶۴۸	۰/۰۲۷	۰/۲۵(۰/۳–۰/۹)
۵/۵	۵۵	۰/۵۰۹	۳۸	۰/۳۵۲	۰/۰۲۷	۱/۹۱(۱/۱۱–۳/۴۶)
DQA1						
۰۲۰۱	۱	۰/۰۰۹	۱۳	۰/۱۲۰	۰/۰۰۴۶	۰/۰۷(۰/۰۲–۰/۴۵)
۰۳۰۱	۴۳	۰/۳۹۸	۱۹	۰/۱۷۶	۰/۰۰۱۶	۳/۱۰(۱/۶۵–۵/۶۵)
DQB1						
۰۳۰۲	۴۳	۰/۳۹۸	۱۸	۰/۱۶۷	۰/۰۰۰۹	۳/۳۱(۱/۷۴–۶/۱)
DRB1						
۰۴۰۱	۴۶	۰/۴۲۶	۱۵	۰/۱۳۹	۲×۱۰^{-۵}	۵/۴۸(۲/۷۶–۱۰/۳۳)

Archive of SID

www.SID.ir

لوکوس DQ الل‌های DQA1*0301 و DQB1*0302به‌ترتیب با HRR برابر ۳/۱ و۳/۳ به‌عنوان مستعدکننده دیابت نوع ۱ شناسایی شدند (جدول ۴) و این نتایج نشان داد لوکوس DQ بیشتر از TNF با دیابت نوع ۱ ارتباط و پیوستگی دارد. نهایتاً, الل‌های DRB1*0401 و DRB1*0301 بیشتر از لوکوس DQ با دیابت نوع ۱ پیوستگی نشان داد (جدول ۵). مقاومترین الل در برابر دیابت DRB1*1500بود (HRR=۰/۰۵، p=۰/۰۰۰۲). این مطالعات در خانواده‌ها نشان دادکه اللهای DRB1*0401 *1500 شدیدتر از الل‌های واقع در لوکوس‌های TNF، HLA-B و DQ به دیابت نوع ۱ پیوسته‌اند.

در ناحیه HLA ژن $DRB1^{Lys71+}$ بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ دارد. آنالیز چندشکلی اسیدهای آمینه در لوکوس‌های DQ (ژنهایDQA1 و DQB1) نشان داد که الل‌های $DQ\beta1^{Asp57-}$ و $DQ\beta1^{Asp57+}$

جدول ۵ ـ فراوانی آلل‌های DRB1 منتقل شده (بیماران) و منتقل نشده (شاهدها) به کودکان مورد مطالعه و خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) در خانواده‌های IDDM دانمارکی

الل‌ها	الل‌های منتقل‌شده دیابت نوع ۱ (تعداد = ۱۵۰)		الل‌های منتقل نشده شاهدها (تعداد = ۱۵۰)		p*	خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
DRB1						
۰۱۰۱	۸	۰/۰۵۳	۱۹	۰/۱۲۷	ns	
۰۱۰۳	۰	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۷	–	
۰۳۰۱	۴۷	۰/۳۱۳	۲۲	۰/۱۴۷	۰/۰۰۴۰	۲/۶۵(۱/۵–۴/۶)
۰۴۰۰	۴	۰/۰۲۷	۸	۰/۰۵۳		
۰۴۰۱	۶۴	۰/۴۲۷	۱۹	۰/۱۲۷	<۱۰–۸	۵/۱۳(۲/۸–۸/۹)
۰۷۰۱	۳	۰/۰۲۰	۱۸	۰/۱۲۰	۰/۰۰۴۵	۰/۱۵(۰/۰۶–۰/۵۱)
۰۸۰۱	۳	۰/۰۲۰	۳	۰/۰۲۰		
۰۹۰۱	۱	۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۷		
۱۱۰۱	۲	۰/۰۱۳	۱۲	۰/۰۸۰	ns	
۱۱۰۳	۱	۰/۰۰۷	۰	۰/۰۰		
۱۲۰۱	۲	۰/۰۱۳	۵	۰/۰۳۳		
۱۳۰۱	۱	۰/۰۰۷	۶	۰/۰۴۰	ns	
۱۳۰۲	۱۱	۰/۰۷۳	۱۲	۰/۰۸۰		
۱۳۰۳	۰	۰/۰۰۰	۱	۰/۰۰۷		
۱۴۰۱	۰	۰/۰۰۰	۴	۰/۰۲۷		
۱۵۰۰	۱	۰/۰۰۷	۱۸	۰/۱۲۰	۲×۱۰–۴	۰/۰۵(۰/۰۲–۰/۳۱)
۱۶۰۰	۲	۰/۰۱۳	۱	۰/۰۰۷		

این الل‌ها در خانواده‌های دیابت نوع ۱ مشاهده نشدند: ۰۱۰۲، ۰۳۰۲، ۰۴۰۶، ۰۴۰۹، ۰۴۱۰، ۰۴۱۱، ۰۴۱۲، ۰۸۰۳، ۰۸۰۵، ۱۰۰۱، ۱۱۰۴، ۱۱۰۵، ۱۱۰۶، ۱۲۰۲، ۱۳۰۴، ۱۳۰۵، ۱۴۰۲، ۱۴۰۳، ۱۴۰۴، ۱۴۰۵، ۱۴۰۶، ۱۴۰۷، ۱۴۰۸.

* p value براساس آزمون دقیق فیشر با تصحیح برای مقایسه چندتایی

ns: non significant

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶ ـ اثر آمینواسیدهای HLA کلاس ۲ در افزایش و کاهش خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای دیابت نوع ۱ در خانواده‌های دانمارکی

اللها	اللهای منتقل شده دیابت نوع		اللهای منتقل نشده شاهدها		p	خطرنسبی (حدود اطمینان)
	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی		
	(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)			
$DRB1^{Lys71+}$	۸۱	۰/۷۵۰	۳۴	۳/۴	$<۱۰^{-۸}$	۶/۵۳(۳/۵–۱۱/۵)
$DRB1^{Lys71-}$	۳۴	۰/۳۱۴	۸۱	۰/۷۵۰	$<۱۰^{-۸}$	۰/۱۵(۰/۰۹–۰/۲۸)
$DQB1^{Asp57-}$	۹۳	۰/۸۶۱	۷۳	۰/۶۷۶	۰/۰۰۱۹	۲/۹۷(۱/۵–۵/۷)
$DQB1^{Asp57+}$	۱۵	۰/۱۳۹	۳۵	۰/۳۲۴	۰/۰۰۱۹	۰/۳۴(۰/۱۸–۰/۶۷)
$DQA1^{Arg52+}$	۹۰	۰/۸۳۳	۵۶	۰/۵۱۹	۱×۱۰^{-۶}	۴/۶۴(۲/۵–۸/۵)
$DQA1^{Arg52-}$	۱۸	۰/۶۱۷	۵۲	۰/۴۸۱	۱×۱۰^{-۶}	۰/۲۲(۰/۱۲–۰/۴۱)
	(تعداد = ۱۵۰)		(تعداد = ۱۵۰)			
$DRB1^{Lys71+}$	۱۱۱	۰/۷۴۰	۳۹	۰/۲۶۰	$<۱۰^{-۸}$	۸/۳۸(۴/۹–۱۳/۸)
$DRB1^{Lys71-}$	۳۹	۰/۲۶۰	۱۱۱	۰/۷۴۰	$<۱۰^{-۸}$	۰/۱۲(۰/۰۷–۰/۲۰)

به‌ترتیب با HRR برابر ۲/۹۷ و ۰/۳۴ باعث بالا رفتن خطر بیماری و مقاومت در برابر بیماری دیابت نوع ۱ می‌شوند. از طرف دیگر الل‌های $DQα1^{Arg52+}$ و $DQα1^{Arg52-}$ به‌ترتیب عامل مستعدکننده و مقاوم‌کننده در برابر بیماری شناخته شدند. با وجود این، الل‌هایی که $DRB1^{Lys71+}$ را کد می‌کنند قویترین پیوستگی را ($P< 1x10^{-8}$ RR=8.38) بادیابت نوع ۱ نشان دادند (جدول ۷).

بررسی هاپلوتیپ

آنالیز هاپلوتیپ‌های چندشکلی اسیدهای آمینه که توسط ژنهای DRB1 , DQA1 و DQB1 در خانواده‌های دیابت نوع ۱ رمزدهی شده‌اند, نشان داد که با اینکه هاپلوتیپ $DQβ1^{Asp57-}$– $Dqα1^{Arg52+}$ – $DRB1^{Lys71-}$ با خود دو الل مستعدکننده دیابت نوع ۱ یعنی $DQβ1^{Asp57-}$ و $Dqα1^{Arg52+}$ را حمل می‌کند، هیچ پیوستگی معنی‌داری با دیابت نوع ۱ ندارد. این در حالی است که وقتی در این هاپلوتیپ الل $DRB1^{Lys71-}$ با الل $DRB1^{Lys71+}$ جایگزین شد, مستعدکننده‌ترین هاپلوتیپ برای دیابت نوع ۱ حاصل گردید (۷/۵۳ = RR $p<۱\times۱۰^{-۸}$). این نشان دهندهٔ نقش عمده $DRB1^{Lys71+}$ در پیدایش دیابت نوع ۱ است. از طرف دیگر با وجود الل مستعدکننده $DQβ1^{Asp57-}$ در هاپلوتیپ $DQβ1^{Asp57-}$– $DRB1^{Lys71-}$، این هاپلوتیپ نسبت به دیابت نوع ۱ مقاوم است. این مسأله نشان‌دهندهٔ نقش محافظتی $DRB1^{Lys71-}$ در برابر دیابت نوع ۱ می‌باشد. نقش محافظتی $DRB1^{Lys71-}$ در هاپلوتیپ $DQβ1^{Asp57+}$ – $DRB1^{Lys71-}$ افزایش یافت؛ این نشانه آن است که الل $DQβ1^{Asp57+}$ یک اثر مثبت بر روی توان محافظتی $DRB1^{Lys71-}$ در مقابله با دیابت نوع ۱ دارد ($p<۱\times۱۰^{-۸}$, HRR=۰/۱۳).

آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین هاپلوتیپ $DQβ1^{Asp57-}$ -$DQα1^{Arg52+}$ –$DRB1^{Lys71-}$ و $DQβ1^{Asp57-}$ -$DQα1^{Arg52+}$ – $DRB1^{Lys71+}$ وجود دارد ($p=۰/۰۰۴$) که این، نقش اصلی $DRB1^{Lys71+}$ را در پیدایش دیابت نوع ۱ تأیید می‌کند.

بحث

برای تأیید نتایج مطالعات قبلی‌مان (۱۹) در یک جمعیت دیگر و اینکه کدام لوکوس در ناحیه HLA بیشتر از سایر لوکوس‌ها با دیابت نوع ۱ پیوسته است و نیز برای مشخص کردن الل‌ها یا ژنوتیپ‌هایی که بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کنند,

Archive of SID

www.SID.ir

چهار نوع مطالعه در جمعیت دانمارک انجام دادیم: ۱) مطالعه گروه بیمار و شاهد؛ ۲) آنالیز پیوستگی جفت فرزندان مبتلا؛ ۳) مطالعه ارتباط بیماری با ژن در خانواده‌ها؛ ۴) مطالعه هاپلوتیپ‌ها. یکی از مزایای بررسی ارتباط بیماری با ژن خاص در خانواده‌ها این است که هر دو گروه بیمار و شاهد از یک جمعیت همگن هستند. از آنجایی که دیابت نوع ۱ احتمالاً نتیجه تعامل عوامل ژنتیکی با عوامل محیطی می‌باشد، یکی دیگر از مزایای مطالعه ارتباط بیماری با ژن در خانواده‌ها این است که افراد مبتلای هر خانواده که الل‌های بیماری را حمل می‌کنند یا حمل نمی‌کنند، بیشتر در عوامل محیطی با هم مشترک هستند؛ بدین ترتیب نقش ژن در پیدایش بیماری بهتر و شفاف‌تر مشخص می‌گردد. در مطالعهٔ قبلی، ما ژن $RB1^{Lys71+}$ را به‌عنوان مهمترین عامل ژنتیکی که باعث دیابت نوع ۱ می شود در جمعیت بلژیک پیدا نمودیم (۱۹) و در مطالعه حاضر نیز ما همین پیوستگی شدید بین $DRB1^{Lys71+}$ و دیابت نوع ۱ را پیدا کردیم (RR=۱۷/۳). در جمعیت دانمارکی, خطری که ژن $DRB1^{Lys71+}$ برای پیدایش دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند حتی بیشتر از جمعیت بلژیکی بود و همچنین افرادی که دو نسخه از الل $DRB1^{Lys71+}$ را حمل می‌کردند میزان خطر آنها برای دیابت نوع ۱ خیلی بیشتر بود

جدول ۷ـ پردازش هاپلوتیپ آمینواسیدهای HLA کلاس ۲ و نقش آنها در آمادگی برای محافظت در برابر دیابت نوع ۱ در خانواده‌های دانمارکی

هاپلوتیپ‌ها	هاپلوتیپ منتقل‌شده دیابت نوع۱		هاپلوتیپ منتقل نشده شاهدها		p	خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)
	تعداد هاپلوتیپ‌ها (تعداد = ۱۸۰)	فراوانی	تعداد هاپلوتیپ‌ها (تعداد = ۱۸۰)	فراوانی		
DRB1-DQA-DQB1						
Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}	۱۰	۰/۰۵۵	۱۳	۰/۰۷۲	ns	
Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57+}	۶	۰/۰۳۳	۲۷	۰/۱۵	۶/۷×۱۰-۴	۰/۲۰(۰/۰۹-۰/۵)
Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57-}	۱۳۱	۰/۷۲۸	۴۷	۰/۲۶۱	<۱۰-۸	۷/۵۷(۴/۷-۱۱/۹)
Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57+}	۷	۰/۰۳۹	۹	۰/۰۵۰	ns	
Lys^{71+}-Arg^{52-}-Asp^{57-}	۰	۰	۰	۰		
Lys^{71+}-Arg^{52-}-Asp^{57+}	۰	۰	۰	۰		
Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57-}	۲۳	۰/۱۲۸	۵۹	۰/۳۲۸	۳/۴×۱۰$^{-۵}$	۰/۳۰(۰/۱۸-۰/۵۲)
Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57+}	۳	۰/۰۱۷	۲۵	۰/۱۳۹	۵/۴×۱۰$^{-۵}$	۰/۱۱(۰/۰۴-۰/۳۵)
Lys^{71-}-Asp^{57-}	۳۴	۰/۱۸۹	۷۲	۰/۰۴	۶/۵×۱۰$^{-۵}$	۰/۳۵(۰/۲۲-۰/۵۷)
Lys^{71-}-Asp^{57+}	۹	۰/۰۵	۵۲	۰/۲۸۹	<۱۰$^{-۸}$	۰/۱۳(۰/۰۷-۰/۲۸)
Lys^{71+}-Asp^{57+}	۷	۰/۰۳۹	۹	۰/۰۵	Ns	
Lys^{71+}-Asp^{57-}	۱۳۱	۰/۷۲۸	۴۷	۰/۲۶۱	<۱۰$^{-۸}$	۷/۵۷(۴/۷-۱۱/۹)
Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}	۱۰	۰/۰۵۵	۱۳	۰/۰۷۲	۰/۰۰۴*	
Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57-}	۱۳۱	۰/۷۲۸	۴۷	۰/۲۶۱		
Lys^{71-}----------Asp^{57-}	۳۴	۰/۱۸۹	۷۲	۰/۰۴	<۱۰$^{-۸}$*	
Lys^{71+}-Asp^{57-}	۱۳۱	۰/۷۲۸	۴۷	۰/۲۶۱		
Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}	۱۰	۰/۰۵۵	۱۳	۰/۰۷۲	ns	
Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57-}	۲۳	۰/۱۲۸	۵۹	۰/۳۲۸		

Archive of SID

www.SID.ir

* تفاوت معنی‌دار بین دو هاپلوتیپ

و این خطر در جمعیت دانمارکی خیلی بیشتر (RR=۱۰۳/۵) از جمعیت بلژیکی بود (RR=۱۵/۴۶). بنابراین نتایج حاضر به‌طور آشکار و قطعی یافته‌های قبلی ما (۱۹) را که $DRB1^{Lys71+}$ ژن اصلی در پیدایش دیابت نوع ۱ است, تأیید می‌کند . ژنوتیپ هوموزیگوت $DRB1^{Lys71-/-}$ بالاترین مقاومت را برای حاملان آن در مقابل دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند در حالی که این مقاومت نه تنها در افراد هتروزیگوت $DRB1^{Lys71-/+}$ وجود نداشت، بلکه تعداد افراد هتروزیگوت در بیماران تقریباً بیشتر بود. از سوی دیگر، در مطالعه قبلی از ۲۱۰ بیمارمطالعه‌شده, ۱۱۰ بیمار هتروزیگوت به $DRB1^{Lys71-/+}$ بودند ولی تعداد آنها در گروه شاهد ۷۰ نفر از ۲۰۵ نفر بود (p=۰/۰۰۰۳ و RR=۲/۱۲). این نتایج یک مدل وراثتی intermediate را برای ژن $DRB1^{Lys71+}$ در بیماری دیابت نوع ۱ پیشنهاد می‌کند .

بر اساس مطالعات سایرمحققان (۲، ۱۱–۱۸)، الل‌هایی که $DQβ1^{Asp57-}$ و $Dqα1^{Arg52+}$ را رمزدهی می‌کنند، در پیدایش خطر برای دیابت نوع ۱ مشارکت دارند. در مطالعه قبلی، ما نشان دادیم که خطر ناشی از $Dqα1^{Arg52+}$ به دلیل خطر $DRB1^{Lys71+}$ برای دیابت نوع ۱ است زیرا این دو ژن روی کروموزوم ۶ پیوستگی شدیدی با هم دارند. در مطالعه قبلی همچنین نشان دادیم که وقتی ژن $DQβ1^{Asp57-}$ همراه $DRB1^{Lys71+}$ به ارث می‌رسد یک اثر افزاینده خطر دارد. از بین ۸۲ خانواده دانمارکی، فقط بیماران ۴ خانواده ژن $DRB1^{Lys71+}$ را با خود حمل نمی‌کردند ولی این بیماران دارای $DQβ1^{Asp57-}$ بودند که نشان می‌دهد, این خطر نه به‌صورت کاملا مستقل از $DRB1^{Lys71+}$ است و نه حالت افزاینده دارد. در این ۹ بیمار که دارای ژنوتیپ $DRB1^{Lys71-/-}$ بودند، غیر از $DQβ1^{Asp57-}$ هیچ ارتباطی با ژنهای مطالعه‌شده DQA1 و HLA-B و TNFA و TNFB پیدا نشد. ما برای اثبات این که الل $DRB1^{Lys71+}$ عمده‌ترین عامل خطر برای دیابت نوع ۱ در ناحیه HLA است، خطرهای هاپلوتیپی(HRRs) را برای همه الل‌هایی که از نظر آماری به‌طور معنی‌دار با دیابت نوع ۱ ارتباط داشتند، حساب کردیم (جدول ۴). از میان آنها HRR الل DRB1*0401 بیشتر از الل‌های ژنهایDQ و TNF بود و وقتی HRR در سطح اسیدهای آمینه محاسبه شد، $DRB1^{Lys71+}$ بیشترین خطر هاپلوتیپی را داشت (جداول ۴، ۵، ۶). در نهایت, نتایج مطالعه حاضر به‌طور قطع یافته‌های قبلی ما (۱۹) را تأیید نمود و علاوه بر آن نقش محافظتی ژن $DRB1^{Lys71-}$ را در برابر دیابت نوع ۱ آشکار ساخت و پیوستگی شدید بین لوکوس DRB1 که اسید آمینهٔ لیزین را در موقعیت ۷۱ زنجیرهβ رمزدهی می‌کند با دیابت نوع ۱ مشخص نمود. نتیجه دیگر اینکه الل $DRB1^{Lys71+}$ در میان همه الل‌های ژنهای مطالعه شده در ناحیهٔ HLA، بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌نماید.

مآخذ

1. Hitman GA, Metcalfe KA. The genetics of diabetes-an update. In: Marshall SM, Home PD, Alberti KGMM, Krall LP (editors*). The Diabetes Annual/7*. Elsevier Science Publishers; 1993. p 1-17.
2. Buyse I, Sandkuyl LA, Zamani Ghabanbasani M, Gu XX, Bouillon R, Bex M, et al. Association of particular HLA class II alleles, haplotypes, and genotypes with susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus in the Belgian population. *Diabetologia* 1994; 37: 808-17.

Archive of SID

www.SID.ir

3. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130-6.
4. Field LL, Tobias R, Magnus T. A locus on chromosome 15q26 (IDDM3) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genetics* 1994; 8: 189-94.
5. Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, et al. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 1994; 371: 161-3.
6. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin dependent) diabetes evidence for polygenecity in man. *Autoimmunity* 1994; 19: 169-78.
7. Cudworth AG, Woodrow JC. Evidence for HLA-linked genes in "juvenile" diabetes mellitus. *BMJ* 1975; 3: 133-5.
8. Nerup J, Cathelineau C, Seignalet J, Thomsen M. HLA and endocrine diseases. In: Dausset J, Svejgaard A (editors). *HLA and Disease.* Munksgaard; 1977. p 149-67.
9. Walker A, Cudworth AG. Type I (insulin dependent) diabetic multiplex families: mode of genetic transmission. *Diabetes* 1980; 29: 1036-9.
10. Platz P, Jakobsen BK, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A, Thomson M, et al. HLA-D and -DR antigen in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981; 21: 108-15.
11. Morel PA, Dorman JS, Todd JA, McDevitt HO. Aspartic acid at position 57 HLA-DQ chain protects against type 1 diabetes: a family study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 8111-5.
12. Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y, Kanazawa Y, Okuyama M, et al. High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DQ beta-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. Diabetes 1990; 39: 266-9.
13. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA-DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 1990; 85: 1315-9.
14. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine* 1990; 322: 1836-41.
15. Dorman JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M. Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 7370-4.
16. Thorsby E, Gjertsen HA, Lundin KA, Ronningen KS. Insulin dependent diabetes mellitus susceptibility or protection may be determined by certain HLA-DQ molecules. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 5: 365-73.
17. Giphart MJ, Roep BO, Drabbels J, D'Amaro J, Bruining J, Abdulkadir J, et al. Relative contribution of HLA-DQA and DQB alleles to predisposition to insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunology* 1992; 34: 142-6.
18. Ronningen KS, Spurkland A, Tait BD, Drummond B, Lopez-Larrea C, Baranda FS, et al. HLA class II association in insulin-dependent diabetes mellitus among Black, Caucasoids, and Japanese. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (editors). *HLA*. London: Oxford University Press; 1991. p 713-22.
19. Zamani M, Spaepen M, Buyse I, Marynen P, Bex M, Bouillon R, et al. Improved risk assessment for IDDM by analysis of amino acids in HLA-DQ and DR1 loci. *European Journal of Human Genetics* 1994; 2: 177-84.
20. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
21. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 9717-21.
22. Ronningen KS, Iwe T, Halstensen TS, Spurkland A, Thorsby E. The amino acid at position 57 of the HLA-DQ chain and susceptibility to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunology* 1989; 26: 215-25.
23. Ronningen KS, Spurkland A, Markussen G, Iwe T, Vartdal F, Thorsby E. Distribution of HLA class II alleles among Norwegian Caucasians. *Human Immunology* 1990; 29: 275-81.
24. Marsh SGE, Bodmer MG. HLA class II nucleotide sequences. Human Immunology 1992; 35: 1-17.
25. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Annals of human genetics* 1955; 19: 251-3.
26. Fisher RA. *The Design of Experiments*. Edinburgh: Oliver & Boyd; 1960. p 258
27. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Annals of Mathematical Statistics* 1958; 29: 1095-111.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Dunn OJ. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 1961; 56: 52-64.
29. Sandkuyl LA. Analysis of affected sib pairs using information from extended families. In: Elston RC, Spence MA, Hodge SE, MacCluer JW (editors). *Multipoint Mapping and Linkage Based upon Affected Pedigree Members: Genetic Analysis Workshop 6*. New York: Alan R. Liss; 1989.
30. Risch N. Assessing the role of HLA linked and unlinked determinants of disease. *American Journal of Human Genetics* 1987; 40: 1-14.
31. Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risk: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculation. *Annals of Human Genetics* 1987; 51: 227-33.
32. Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *American Journal of Human Genetics* 1994; 55: 402-9.
33. Knapp M, Seuchter SA, Baur MP. The haplotype-relative risk (HRR) method for analysis of association in nuclear families. *American Journal of Human Genetics* 1993; 52: 1085-93.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir