

بررسی ارتباط گروه آلی HLA-DQB1*03 با بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) در تهران

مرضیه صالحی سیاوشانی^۱، روح‌الله نخعی سیستانی^{۲*}، علیرضا پناهی^۳

۱- کارشناس ارشد، زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

*نویسنده مسئول: r.nakhaei@kashanu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۹

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

چکیده

هدف: بیماری مالتیپل اسکلروزیس در کشور ما به علت شیوع بالا و سن ابتلای پایین اهمیت به‌سزایی دارد. این بیماری فشار زیادی بر افراد مبتلا و سیستم حفظ سلامت تحمیل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که محتوای ژنتیکی افراد یکی از عوامل مؤثر در ابتلا به این بیماری محسوب می‌شود. یکی از این عوامل، ژن‌های سازگاری بافتی هستند که محصول آنها پپتیدهای بیگانه را به‌منظور شناسایی به‌وسیله لئوسیت‌ها روی سطح خود عرضه می‌کنند. در این پژوهش، ارتباط HLA-DQB1*03 در شهر تهران به کمک سیستم مبتنی بر PCR مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهد، ۳۶۷ نمونه خون از افراد بیمار و سالم جمع‌آوری شد که شامل ۱۷۲ فرد بیمار و ۱۹۵ فرد سالم بود. نمونه‌ها به لحاظ سن و جنسیت با یکدیگر مشابهت داشتند.

DNA از خون استخراج و از روش PCR به‌منظور شناسایی حضور آلل استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه نشان داده شد که آلل HLA-DQB1*03 در مردان به‌طور معناداری بیشتر از زنان است ($p=0.002$). همچنین آلل بررسی‌شده در افراد بیمار فرکانس کمتری نسبت به افراد سالم دارد؛ یعنی ۵۳ درصد در مقابل ۶۷ درصد و این اختلاف فراوانی معنادار است ($p=0.02$).

نتیجه‌گیری: آلل DQB1*03 به‌طور معناداری در بیماران MS کمتر از افراد سالم است و این رابطه در افراد مذکر قوی‌تر دیده می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که این آلل نقش محافظتی در مقابل بیماری MS دارد.

کلید واژگان: مالتیپل اسکلروزیس، فراوانی ژن، پلی‌مورفیسم، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.

مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس^۱ یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قرن بیستم به شمار می‌رود [۱]. سن ابتلای به این بیماری ۱۰ تا ۵۹ سال گزارش شده که در بیشتر موارد سن شروع ۲۰-۴۰ سال است [۲]. این اختلال عصبی خودایمن، طیفی از بیماری‌ها را بروز می‌دهد که ناشی از نداشتن تعامل سیستم ایمنی و اعصاب است [۳]. MS بیماری پیش‌رونده، چندفاکتوری و مزمن است که موجب تشکیل ضایعات چندگانه عصبی مرکزی و ازبین‌رفتن غشای میلین می‌شود. سرعت هدایت عصب^۲ در حدود ۵ درصد بیماران با آسیب عصب محیطی تغییر کرده و بر ساقه مغز، مخچه و طناب عصبی اثر می‌گذارد [۴؛ ۵].

دو نوع دیگر این بیماری که به‌تازگی معرفی شده است، شامل CIS^۳ و RIS^۴ می‌شود. نوع CIS خوش‌خیم و بدون علامت است که ۳۰-۷۰ درصد افراد را درگیر می‌کند و نوع RIS نیز بدون علائم بوده و تنها از راه MRI قابل تشخیص است و ۳۰ درصد بیماران را درگیر می‌کند [۲؛ ۶].

علت شناسی این بیماری و بررسی‌های اپیدمیولوژی نشانگر تأثیر فاکتورهایی مانند زمینه ژنتیکی، سازوکار خودایمنی و عوامل محیطی مانند عفونت‌های ویروسی است [۷-۱۱]. همچنین ارتباط مشخصی میان ژن‌های سازگاری بافتی^۵ و بیماری MS دیده شده است. ژن‌های سازگاری بافتی چندین ژن به هم پیوسته و به‌شدت پلی‌مورفیک و پلی‌ژنیک هستند [۲؛ ۱۲]، محصول این ژن‌ها مولکول‌های پروتئینی هستند که بر سطح غشای سلول‌های مهره‌داران قرار می‌گیرند و وظیفه آنها ارائه پپتیدهای بیگانه به لنفوسیت‌هاست. نوع انسانی این آنتی‌ژن‌ها که روی لوکوسیت قرار گرفته است، آنتی‌ژن

لوکوسیت انسانی^۶ نام دارد [۲؛ ۱۲]. مطالعه‌ای که به‌وسیله سوآسر و همکاران در ۱۹۹۶ انجام شده، نشان از ارتباط ناحیه MHC که روی کروموزوم 6p21 قرار دارد، با بیماری MS بوده است [۶؛ ۱۳]. پروتئین HLA نقشی کلیدی در پاسخ ایمنی بدن ایفا می‌کند و تنظیم‌کننده رشد و بلوغ سلول‌های T در تیموس است [۲]. کمپلکس HLA در خوشه‌ای متراکم از ژن‌ها قرار گرفته است که در بازوی کوتاه کروموزوم ۶ در 6p21.3 قرار دارد. قطعه تلومری حاوی ژن‌های کلاس ۱ و ناحیه نزدیک به سانترومر کدکننده ژن‌های کلاس ۲ است. پلی‌مورفیسم این ژن‌ها نقشی اساسی در تشخیص ایمنی خودی و غیرخودی بازی می‌کند. همچنین غربالگری ژنومی در آمریکا نقش HLA در بیماری‌زایی MS را تأیید کرده است [۲؛ ۱۲].

با توجه به شیوع بیشتر بیماری MS در جامعه، پایین بودن سن ابتلا و عوارض ناخوشایند بیماری بر CNS شناسایی و تشخیص زودهنگام بیماری از لحاظ ژنتیکی می‌تواند کمک بسیاری به پزشکان در پیشگیری بیماری باشد. بررسی ارتباط آلل HLA-DQB1*03، از ژن‌های HLA از اهداف این پژوهش است چرا که به نظر می‌رسد ژن HLA-DQB1*03 می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای شناسایی بیماران MS باشد. هرچند ایران در منطقه کم‌خطر آسیا از نظر بروز این بیماری واقع شده است، اما بروز این بیماری در ایران با کشورهای غربی مشابه دارد [۱۴]. مطالعات قبلی بروز دوبرابری بیماری MS در مناطق شمالی شهر تهران در مقایسه با مناطق جنوبی را تأیید کرده است [۱۵]. به این منظور افزایش میزان ژن HLA-DQB1*03 در شهر تهران به کمک سیستم مبتنی بر PCR بررسی شد.

مواد و روش

۶ Human Leukocyte Antigen, HLA

۱ Multiple sclerosis, MS

۲ Conduction Velocity

۳ Clinically Isolated Syndrome

۴ Radiologically Isolated Syndrome

۵ Major Histocompatibility Complex, MHC

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه ۳۶۷ نمونه خون افرادی که بین سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ به آزمایشگاه تشخیص طبی یکتا شهر تهران مراجعه و آزمایش شده بودند، جمع‌آوری شد. لازم به ذکر است نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل ۱۷۲ نمونه خون فرد مبتلا به MS و ۱۹۵ فرد سالم از لحاظ این بیماری است. اطلاعات موردنیاز درخصوص تعداد و شرایط افراد تحت آزمایش نسبت به سن، جنسیت و وضعیت آنها استخراج و ثبت شد. برای نمونه‌گیری، نمونه خون افراد آزمایش شده در لوله خون‌گیری حاوی K₂EDTA ریخته و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. این مطالعه پس از گرفتن رضایت‌نامه کتبی از بیماران و با رعایت موازین اخلاقی پژوهش با دریافت کد اخلاق IR.UMZ.REC.1399.30 انجام شده است.

استخراج DNA از نمونه‌های خونی

۵ میلی‌لیتر بافر A [Tris-HCl] ۱۰ میلی‌مولار، پتاسیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار، منیزیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار و EDTA ۲ میلی‌مولار] به ۵ میلی‌لیتر نمونه خون اضافه شد. سپس ۱۲۵ میکرولیتر تریتون X100 اضافه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور RPM ۲۲۰۰ سانتیفریوژ شد. این مرحله دو بار تکرار شد. رسوب حاصل در ۰/۸ میلی‌لیتر از بافر پریمک B (Tris-HCl) ۱۰ میلی‌مولار، پتاسیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار، منیزیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۲ میلی‌مولار و سدیم کلراید ۴۰۰ میلی‌مولار) حل شد. سپس ۵۰ میکرولیتر SDS برای تخریب غشای سلولی و حذف لیپید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ سانتیگراد نگهداری شد. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر NaCl ۶ مولار اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دور RPM ۱۲۰۰۰ سانتیفریوژ شد. مایع رویی که حاوی DNA است، به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و به میزان دو برابر حجم آن، اتانول خالص اضافه شد سپس

رسوب DNA جدا شده و به رسوب DNA، ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دور RPM ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتیفریوژ شد. بعد از خشک‌شدن رسوب حاصل در دمای اتاق، در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-HCl) ۱۰ میلی‌مولار و EDTA ۱ میلی‌مولار) حل و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

به‌منظور تنظیم مراحل مختلف PCR و نیز به‌عنوان کنترل مثبت آزمایش، از رده سلولی K562 (اعطاشده از دانشگاه تربیت مدرس) که واجد آلل QQB1*03 است، استفاده شد.

انجام PCR

طراحی پرایمر

توالی تمام آلل‌های ژن HLA از پایگاه داده dbMHC (NCBI) به دست آمد. از آنجایی که توالی آلل‌های ژن HLA با هم متفاوت هستند، به‌منظور به‌دست‌آوردن نواحی مشترک بین این توالی‌ها، تمام زیر مجموعه‌های توالی آلل HLA-DQB1*03 با استفاده از نرم‌افزار MegAlign هم‌تراز شدند. طراحی پرایمر از روی توالی نواحی مشترک به‌نحوی انجام شد که با توالی سایر آلل‌های DQB1 اختلاف داشته باشد و به‌منظور اختصاصیت بیشتر در انتهای ۳۶ براساس قانون قوت و ضعف جفت بازی یک ناجور باز ۷ هم قرار داده شد. دو پرایمر پیشرو و پیرو با توجه به توالی مشترک به‌دست‌آمده، طراحی و سنتز شد.

نام	توالی	Tm	طول آمپلی کن
F03	TAC ATC TAT AAC CGA GAG GAG TAC CCA	۶۶/۶	۱۵۳bp
R03	GTC TGC ACA CCG TGT CCA ACT	۶۳/۲	۱۵۳bp

PCR

واکنش PCR در مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر (۰/۴ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۳ میلی مولار dNTP، بافر 10x، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر و ۰/۱U آنزیم Taq پلی-مراس) به همراه DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های توموری با غلظت نهایی ۱ میکروگرم بر میکرولیتر و آب دیونیزه به مقدار مناسب انجام گرفت.

واکنش PCR تحت شرایط چرخه حرارتی با استفاده از دستگاه ترمو سايکلر BioRad انجام گرفت. مراحل انجام واکنش PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس به میزان ۳۳ چرخه که هر چرخه شامل مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۲/۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و در انتها مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پرایمرهای نواحی مشترک ژن HLA-DQB1*03 محصولی به طول ۱۵۳ جفت باز تشکیل می‌دهند. با توجه به اختلاف‌های زیادی که توالی‌های این ژن داشت، ناحیه مشترک فقط در

بازه‌ای قرار گرفته بود که می‌توانستیم آمپلی کنی به طول 153 bp را تکثیر کنیم.

پس از PCR، محصولات حاصل بر ژل ۱/۵ درصد آگارز به مدت ۱/۵ ساعت و با ولتاژ ۹۰ ولت به وسیله دستگاه ژل الکتروفورز شرکت اختریان بارگذاری شد.

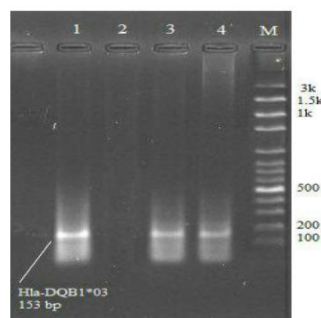
تجزیه و تحلیل آماری

پس از بررسی ژن HLA-DQB1*03 در ۱۷۲ بیمار و ۱۹۵ فرد سالم، معنادار بودن یا نبودن ارتباط این ژن با MS با استفاده از آزمون مربع کای بررسی شد. در تمامی موارد مطالعه، نتایج در صورت دارا بودن $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنادار شناخته شدند. به منظور انجام محاسبه‌های آماری، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی نسبت فراوانی ژن HLA-DQB1*03

تصویر ژل آگارز میزان فراوانی ژن HLA-DQB1*03 در بیماران مبتلا به MS و نیز افراد سالم بعد از انجام واکنش PCR در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن HLA-DQB1*03 بر ژل آگارز ۱/۵ درصد: (M) مارکر، (۱) DNA سلول K562 حاوی ژن موردنظر (کنترل مثبت)؛ (۲) کنترل منفی؛ (۳) نمونه سالم حاوی ژن موردنظر؛ (۴) نمونه بیمار حاوی ژن موردنظر

نتایج بعد از انجام واکنش PCR بر DNA استخراج شده از نمونه خونی ۳۶۷ فرد مورد مطالعه در شهر تهران نشان می‌دهد، نسبت فراوانی ژن HLA-DQB1*03 بدون در نظر گرفتن سن، جنس و وضعیت فرد نسبت به بیماری، ۲۱۹ فرد (۵۹/۷ درصد) از نظر داشتن ژن HLA-DQB1*03 مثبت و ۱۴۸ فرد (۴۰/۳ درصد) منفی هستند.

نتایج آماری

۳۶۷ فرد بررسی شده براساس سن به دو گروه کمتر یا مساوی ۴۰ و بیشتر از ۴۰ سال دسته‌بندی شده و فراوانی هر دسته در جمعیت محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد ۶۰/۸ درصد افراد کمتر یا مساوی ۴۰ سال و ۳۹/۲ درصد بالای ۴۰ سال می‌باشند. همچنین از لحاظ جنسیت ۷۶/۲ درصد مؤنث و ۲۳/۷ درصد مذکر هستند. از لحاظ وضعیت بیماری نیز ۵۳/۱ درصد افراد سالم و ۴۶/۸ درصد آنها مبتلا به MS بودند.

همان‌طور که ذکر شد، در کل ۳۶۷ فرد در این مطالعه بررسی شدند که ۲۲۳ نفر آنها بیشتر یا مساوی ۴۰ سال و ۱۴۴ نفر آنها زیر ۴۰ سال سن داشتند. در بین افراد ۴۰

سال و مسن‌تر، ۶۰/۰۸ درصد (۱۳۴ نفر) واجد آلل HLA-DQB1*03 بودند و بقیه بدون این آلل بودند. از افراد زیر ۴۰ سال، ۵۹/۰۲ درصد (۸۵ نفر) این آلل را داشتند و سایر افراد بدون آن بودند. آزمون مربع کای اختلاف معناداری را بین فراوانی آلل بررسی شده در دو گروه سنی تأیید نکرد ($P=0.84$).

از لحاظ جنسیت، ۷۳/۵۶ درصد از افراد مذکر و ۵۵/۳۵ درصد از افراد مؤنث ژن HLA-DQB1*03 داشتند. در واقع وجود ژن در افراد مذکر بیشتر بوده است. همچنین نتایج آزمون مربع کای نیز درصد اختلاف معناداری بین میانگین داده‌ها برای دو گروه مؤنث و مذکر گزارش کرده است ($P=0.002$).

از ۲۱۹ فردی که در این مطالعه ژن HLA-DQB1*03 دارند، ۹۲ فرد [۵۳ درصد] بیمار و ۱۲۷ فرد (۶۵ درصد) سالم هستند. نتایج آزمون مربع کای ارتباط معناداری بین فراوانی ژن HLA-DQB1*03 و وضعیت بیماری در بین جمعیت مطالعه شده نشان داد ($P=0.02$) (جدول ۱).

جدول ۱ ارتباط میزان فراوانی ژن HLA-DQB1*03 با متغیرهای سن، جنسیت و وضعیت فرد نسبت به بیماری

متغیر	تعداد	دارای آلل ژن HLA-DQB1*03	درصد فراوانی ژن HLA-DQB1*03	P
سن				
≥ 40	۲۳۳	۱۳۴	۶۰/۰۸	۰/۸۴
< 40	۱۴۴	۸۵	۵۹/۰۲	
جنسیت				
مرد	۸۷	۶۴	۷۳/۵۶	۰/۰۰۲
زن	۲۸۰	۱۵۵	۵۵/۳۵	
وضعیت فرد نسبت به بیماری				
سالم	۱۹۵	۱۲۷	۶۵/۱۲	۰/۰۲۳
بیمار	۱۷۲	۹۲	۵۳/۴۸	

میان فراوانی این ژن در گروه مذکر نسبت به مؤنث دیده شد. در نهایت ارتباط معناداری بین وضعیت بیماری - جنسیت با وجود ژن HLA-DQB1*03 به وسیله آزمون مربع کای تأیید شد ($P=0.002$) (جدول ۲).

ارتباط وضعیت بیماری و جنسیت نشان داد که میان ۲۸۰ فرد مؤنث مطالعه شده، (۶۲ بیمار و ۹۳ فرد سالم دارای ژن HLA-DQB1*03) در مقایسه با ۸۷ فرد مذکر مطالعه شده (۳۰ بیمار و ۳۴ فرد سالم دارای ژن مذکور)، تفاوت بسیاری وجود دارد. همچنین تفاوت چشمگیری

جدول ۲ میزان فراوانی ژن HLA-DQB1*03 نسبت به وضعیت بیماری - جنسیت

P	متغیر				تعداد	وضعیت فرد نسبت به بیماری
	جنسیت [فراوانی ژن HLA-DQB1*03]					
	زن		مرد			
۰/۰۰۲	دارای آلل	درصد فراوانی	دارای آلل	درصد فراوانی		
	۷۳/۲۲	۹۳	۲۶/۷۷	۳۴	۱۲۷	سالم
	۶۷/۳۹	۶۲	۳۲/۶	۳۰	۹۲	بیمار

افرادی با سن کمتر یا مساوی ۴۰ سال می باشند، ارتباط معناداری بین توزیع فراوانی ژن HLA-DQB1*03 با وضعیت بیماری - سن فرد بیمار گزارش نشد ($P=0.06$) (جدول ۳).

از بین ۱۷۲ بیمار مطالعه شده، ۹۲ فرد دارای ژن HLA-DQB1*03 هستند که ۶۶ فرد کمتر یا مساوی ۴۰ سال بودند. از ۱۹۵ فرد سالم، ۱۲۷ فرد از لحاظ داشتن این ژن مثبت بوده که ۶۸ فرد سنی کمتر یا مساوی ۴۰ سال داشتند. با توجه به اینکه بیشتر جمعیت مورد مطالعه،

جدول ۳ میزان فراوانی ژن HLA-DQB1*03 نسبت به وضعیت - سن

P	متغیر				تعداد	وضعیت فرد نسبت به بیماری
	سن [فراوانی ژن HLA-DQB1*03]					
	< 40		≥ 40			
۰/۰۶	دارای آلل	درصد فراوانی	دارای آلل	درصد فراوانی		
	۴۶/۴۵	۵۹	۵۳/۵۴	۶۸	۱۲۷	سالم
	۲۸/۲۶	۲۶	۷۱/۷۳	۶۶	۹۲	بیمار

می تواند عاملی جهت کنترل سریع، کم هزینه و آسان باشد. نتایج نشان داد که ۵۹/۷ درصد افراد مورد مطالعه دارای آلل HLA-DQB1*03 می باشند. اثر عامل سن بر فراوانی ژن HLA-DQB1*03 معنادار نیست در حالی که ارتباط معناداری بین جنسیت و بیماری با وجود آلل

بحث و نتیجه گیری

با توجه به میزان شیوع بیشتر بیماری MS در جامعه و کاهش سن ابتلا و نیز عوارض حاصل از بیماری تشخیص زودهنگام بیماری حایز اهمیت است. بررسی فراوانی ژن HLA-DQB1*03 در بیماران مبتلا به MS و افراد سالم

و اگرچه زیر شاخه‌هایی از آن ارتباط مثبتی با شدت بیماری MS نشان می‌دهند، اما همان‌طور که این مطالعه نشان داد، وجود این آلل در فرد تا حدودی می‌تواند اثر محافظتی در خصوص ابتلا به MS داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این کار با استفاده از پژوهانه به شماره ۴۶۳۵۹۶ دانشگاه کاشان انجام شده است. همچنین نویسندگان از آزمایشگاه یکتا و سرکار خانم نامجو بابت همکاری در تهیه نمونه‌ها تشکر می‌کنند.

منابع

- [1] Compston A. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997;62[6]:553.
- [2] Sadovnick AD, Dymment D, Ebers G. Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Epidemiologic reviews*. 1997;19[1]:99-106.
- [3] Mohammed EMJ. Multiple sclerosis is prominent in the Gulf states. *Pathogenesis*. 2016;3[2]:19-38.
- [4] Saberi A, Akhondzadeh S, Kazemi S. Infectious agents and different course of multiple sclerosis: a systematic review. *Acta neurologica Belgica*. 2018; 118[3], 361-377.
- [5] Warabi Y, Yamazaki M, Shimizu T, Nagao M. Abnormal nerve conduction study findings indicating the existence of peripheral neuropathy in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BioMed research international*. 2013;2013.
- [6] Koriem KMM. Multiple sclerosis: New insights and trends. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6[5]:429-40.
- [7] Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors,

HLA-DQB1*03 وجود دارد. اثر متقابل بیماری-سن فاقد اختلاف معنادار بوده درحالی که اثر متقابل بیماری-جنسیت دارای اختلاف معنادار است.

در مطالعه انجام شده به وسیله ورزی و همکاران که به منظور بررسی میزان فراوانی آلل‌های مختلف HLA-DQB1 انجام گرفت، نشان داده شد که فراوان‌ترین آلل‌های موجود در این جمعیت آلل DQB1*0301 با فراوانی ۴۰ درصد و آلل DQB1*0303 با فراوانی ۱۰ درصد هستند [۱۶]. در مطالعه مشابه توسط امیرزرگر و همکاران فراوانی آلل‌های DQB1*0301، DQB1*0302 و DQB1*0303 به ترتیب ۳۱، ۵/۵ و ۴ درصد نشان داده شد [۱۷]. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که فراوانی گروه آلی ۰۳ در نمونه بررسی شده بالاست.

در مطالعه ورنک^۸ و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که ۳۵ آلل متفاوت در ۸۶ فرد گروه بیمار و ۱۷ آلل متفاوت در ۶۰۶ فرد گروه شاهد وجود دارد که در گروه بیمار آلل DQB1*0302 و در گروه شاهد آلل DQB1*0301 بیشترین فراوانی را دارند [۱۸]. در مطالعات مشابه انجام شده در ایران توسط کلائی و همکاران بر ۱۲۰ بیمار مبتلا به MS، تأثیر HLA-DQB1*0303 بر شدت بیماری MS نشان داده شد [۱۹]. در مطالعه امیرزرگر و همکاران در جمعیت ایرانی با استفاده از روش PCR و RFLP بر ۴۳ بیمار مبتلا به MS و ۱۰۰ فرد غیر مبتلا، نشان داده شد که در بین آلل‌های HLA-DQB1 آلل HLA-DQB1*05 بیشترین فراوانی را در بین بیماران مبتلا به MS دارد و فراوانی آلل HLA-DQB1*03 مانند مطالعه حاضر در افراد بیمار کمتر از افراد سالم است [۱۷].

نتیجه گیری کلی

بنابراین به نظر می‌رسد که گروه آلی HLA-DQB1*03 با فرکانس بالایی در نمونه‌های بررسی شده ایران وجود دارد

^۸ Werneck

- [14] Sadovnick AD, Ebers G. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 1993;20[1]:17-29.
- [15] Russell B. The pathogenesis of multiple sclerosis revisited. *JR Coll Physicians Edinb*. 2002;32:244-65.
- [16] Varzi AM, Shahsavari F, Tarrahi M. Distribution of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in Lak population of Iran. *Human immunology*. 2016;77[7]:580-3.
- [17] Amirzargar A, Mytilineos J, Yousefipour A, Farjadian S, et al. HLA class II [DRB1, DQA1 and DQB1] associated genetic susceptibility in Iranian multiple sclerosis [MS] patients. *European journal of immunogenetics*. 1998;25[4]:297-301.
- [18] Werneck LC, Lorenzoni PJ, Arndt RC, Kay CSK, et al. The immunogenetics of multiple sclerosis. The frequency of HLA-alleles class 1 and 2 is lower in Southern Brazil than in the European population. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2016;74[8]:607-16.
- [19] Kollaee A, Ghaffarpor M, Ghlichnia H, Ghaffari S, et al. The influence of the HLA-DRB1 and HLA- DQB1 allele heterogeneity on disease risk and severity in Iranian patients with multiple sclerosis. *International journal of immunogenetics*. 2012;39[5]:414-22.
- prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*. 2010;9[7]:727-39.
- [8] Ascherio A, Munger KL. Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2010;5[3]:271-7.
- [9] Rubicz R, Yolken R, Drigalenko E, Carless MA, et al. A genome-wide integrative genomic study localizes genetic factors influencing antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). *PLoS genetics*. 2013;9[1]:e1003147.
- [10] Marrosu MG, Cocco E, Costa G, Murru MR, et al. Interaction of loci within the HLA region influences multiple sclerosis course in the Sardinian population. *Journal of neurology*. 2006;253[2]:208-13.
- [11] Ochs-Balcom HM, Wiesner G, Elston R. Human Genome Epidemiology [HuGE] Review. *American Journal of Epidemiology*. 2007;166[3]:246-54.
- [12] Kalanie H, Kamgooyan M, Sadeghian H, Kalanie A. Histocompatibility antigen [HLA] associations with multiple sclerosis in Iran. *Multiple Sclerosis Journal*. 2000;6[5]:317-9.
- [13] Baranzini S. Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Current opinion in genetics & development*. 2011; 21[3]:317-24.

Investigating the association between HLA-DQB1*03 with multiple sclerosis [MS] in Tehran

Marzieh Salehi Siavashani¹, Roohollah Nakhaei Sistani^{2*}, Alireza Panahi³

1-Graduate student, Dept. of Cell and molecular biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.

2-Professor Assistant, Dept. of Cell and molecular biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran.

3-Professor Assistant, Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Mohaqeq Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding author: r.nakhaei@kashanu.ac.ir

Received: 2021/3/16

Accepted: 2021/11/30

Abstract

Aim: Multiple sclerosis is important in Iran because of its high prevalence and low age of onset. It exerts a large burden on affected people and the health care system. Studies have shown that the genetic content of humans has a critical role in MS. The histocompatibility loci which their products present the foreign antigenic peptides for detection by lymphocytes are of MS associated genetic elements. In this study, the association of HLA-DQB1*03 with MS was studied in Tehran, using a PCR-based system. **Methods:** In this case-control study, a total of 367 blood samples were collected from 172 patients and 195 healthy people. Both groups were similar in age and gender. Blood DNA was extracted, and PCR technique was used to identify the presence of the allele. **Results:** In this study, the HLA-DQB1*03 allele in men was significantly higher than that of women ($p = 0.002$). Also, the allele was less frequent in patients than in healthy subjects (53% versus 67%), and this difference is significant ($p = 0.02$).

Conclusions: The DQB1*03 allele is significantly lower in patients with MS than in healthy people, and this relationship is more pronounced in male subjects. Therefore, it seems that this allele plays a protective role against MS disease.

Keywords: Multiple Sclerosis, Gene Frequency, Polymorphism, Polymerase Chain Reaction.