

## بررسی ارتباط بین ال‌های ژن HLA-DQB1 با بیماری روماتوئید آرتریس در جمعیت استان خراسان

فرناز شجاع طاهری<sup>۱</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۲\*</sup>، جلیل توکل افشاری<sup>۳</sup>

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دکترای ژنتیک مولکولی، دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دکترای ایمونوژنتیک، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، مشهد، ایران

### چکیده

**هدف:** روماتوئید آرتریس (RA) شایعترین بیماری التهابی مزمن و مخرب مفصلی است که انتشار جهانی دارد و شیوع آن در سطح جهان حدود ۰/۵ تا ۱ درصد می‌باشد. برای تشخیص قطعی بیماری RA در مراحل اولیه بیماری روش آزمایشگاهی مشخصی موجود نمی‌باشد و از آنجا که تشخیص سریع آن بسیار حایز اهمیت است، استفاده از روشهای مولکولی می‌تواند در تشخیص به موقع و دقیق بیماری بسیار مؤثر باشد. با وجود این که هنوز علت اصلی این بیماری خود ایمن شناخته نشده است، ولی فاکتورهای ایمنی‌شناختی و ژنتیکی نقش عمده‌ای در آسیب‌زایی بیماری بازی می‌کنند. با توجه به نقش کلیدی ژنهای مجموعه سازگاری بافتی در بروز بیماریهای خودایمن، در این تحقیق بر آن شدیم تا تنوع اللی ژن HLA-DQB1 از این مجموعه را بین دو گروه بیمار و سالم مقایسه و بررسی کنیم که آیا ال خاصی از HLA-DQB1 می‌تواند به عنوان شاخص ژنتیکی بیماری قرار گیرد یا خیر.

**مواد و روشها:** در این مطالعه از ۲۵ فرد بیمار مبتلا به روماتوئید آرتریس و ۸۶ فرد سالم استفاده شد. DNA ژنومی از خون این افراد به روش غیر آنزیمی رسوب نمکی استخراج و سپس ژنوتیپ HLA با تکنیک PCR-SSP تعیین شد.

**نتایج:** با مقایسه نتایج به دست آمده بین دو گروه بیمار و کنترل، فراوانی ال‌های HLA-DQ5 و HLA-DQ8 در گروه بیمار به ترتیب ۵۶ درصد (۳۱/۴ درصد در گروه کنترل) و ۲۴ درصد (۵/۸ درصد در گروه کنترل) مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل، دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد.  $P < 0.05$  و به ترتیب ۰/۰۳۳ و ۰/۰۰۷. میزان مخاطره نسبی برای دو ال فوق نیز عددی بزرگتر از ۱ برآورد شد (به ترتیب ۲/۶ و ۵/۱).

**بحث و نتیجه‌گیری:** از آنجا که ال‌های HLA-DQ5 و HLA-DQ8 در بیماران نسبت به افراد سالم بیشتر دیده می‌شوند، می‌تواند در افزایش ریسک ابتلا به بیماری RA در جمعیت خراسانی نقش داشته باشند، از این رو می‌تواند به عنوان یک شاخص مولکولی در تشخیص و پیش‌آگهی بیماری روماتوئید آرتریس استفاده شوند.

کلید واژگان: HLA، تعیین نوع HLA، PCR-SSP، بیماری آرتریس روماتوئید.

### ۱- مقدمه

روماتوئید آرتریس (RA) بیماری مزمن التهابی خود ایمنی است که بیشتر، غشاهای سینوویال مفاصل را درگیر می‌کند. در این بیماری، التهاب در غشای مفاصل با گذشت زمان، می‌تواند موجب تخریب مفاصل و در نتیجه دردهای مزمن، از دست دادن قدرت تحرک و ناتوانی شود. درگیری خارج مفصلی که اندامهای متعددی را درگیر می‌کند نیز، در تعداد بسیاری از بیماران دیده

\* نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، بخش زیست‌شناسی، گروه ژنتیک، تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱، دورنگار: ۸۸۰۰۹۳۳۰

چند شکلی<sup>۴</sup> بسیار بالایی داشته و به دلیل فرکانس پایین نوترکیبی بین آنها، بخصوص بین لوکوس‌های HLA-DQB1 و HLA-DRB1، دارای پیوستگی ترجیحی<sup>۵</sup> بالایی دارند [۱۱]. به دلیل میزان بالای پیوستگی ترجیحی بین این الل‌ها، تعیین میزان نقش هر کدام از آنها در بروز بیماری RA مشکل است. پیوستگی ترجیحی بالا بین این الل‌ها، موجب به‌وجود آمدن هاپلوتایپ‌های<sup>۶</sup> استاندارد و معینی بین الل‌های مختلف ژنهای HLA می‌شود [۱۲،۱۱].

اولین بار ارتباط HLA کلاس دو با بیماری RA به‌وسیله<sup>۷</sup> استاستنی<sup>۷</sup> در سال ۱۹۷۶ گزارش شد. استاستنی گزارش کرد که الل R4DW4 در بیماران مبتلا به RA، به میزان بسیار زیادی افزایش یافته است [۱۴،۱۳]. از آن زمان مطالعاتی در جمعیت‌های مختلف انجام شده و ارتباط الل DRB1\*0401 و الل‌های مرتبط با آن با بیماری، بارها گزارش شده و به اثبات رسیده است [۱۵].

در سفیدپوستان شمال آمریکا و شمال اروپا، فراوانی الل‌های HLA-DRB1\*0401،\*0401،\*0401 [۱۷،۱۶] و در ترکها و سفیدپوستان آلمان فراوانی الل‌های HLA-DRB1\*0401،\*0408،\*0401 [۱۹،۱۸]. در مبتلایان به RA نسبت به افراد سالم بیشتر است [۱۹،۱۸]. تحقیقات انجام شده بر روی جمعیت‌های ژاپنی، چینی، کره‌ای، هندی و اسپانیایی، الل HLA-DRB1\*0405 در بیماران به میزان بیشتری مشاهده شده است [۲۰،۲۱،۲۲،۲۳]. با وجود فراوانی پایین الل HLA-DRB1\*0901 در جمعیت‌ها، ارتباط این الل با بیماری روماتوئیدآرترویتیس به‌وسیله<sup>۸</sup> واکیتان<sup>۸</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۸ در جمعیتی از ژاپنی‌ها گزارش شده است [۲۴].

در یهودیان ارتباط این بیماری با الل HLA-DRB1\*0102 و در یونانیان [۲۵] و برخی دیگر از جمعیت‌های اسپانیایی و هندی نیز با الل HLA-DRB1\*1001 مشاهده شده است. در مکزیک‌های ساکن آمریکا و بومیان آمریکایی نیز الل HLA-DRB1\*1402 با بیماری ارتباط دارد [۲۳].

در تحقیقی که ستار<sup>۹</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۰ انجام دادند، گزارش شد که در اعراب الل DR3 در بیماران نسبت به افراد سالم به میزان بیشتری دیده می‌شود [۲۶] ولی در مطالعه دیگری که سالها بعد در سال ۲۰۰۴ آل‌سعید<sup>۱۰</sup> و همکاران روی کویتی‌ها انجام دادند ارتباط الل HLA-DRB1\*04 با بیماری مشاهده شد (مقاله در دست چاپ). در مطالعات انجام شده روی الل‌های مختلف ژن HLA-DRB1 ارتباط زیرگروه‌های مختلف الل‌های

می‌شود. این بیماری بیشتر در میزبانهای مستعد از نظر ژنتیکی، بروز می‌کند و عوامل خارجی مؤثر در پیشرفت بیماری، هنوز ناشناخته‌اند [۱]. این نظریه که بیماری RA می‌تواند پیش‌زمینه ژنتیکی داشته باشد از مطالعه خانواده‌هایی که بیماری به صورت گروهی در آنان دیده می‌شود و مطالعه دوقلوهای مونوزیگوت<sup>۱</sup> و دی‌زیگوت<sup>۲</sup> به دست آمده، تحقیقات ژنتیکی نیز مؤید این نظریه است [۲،۱].

روماتوئیدآرترویتیس در سراسر جهان گسترش دارد و در همه نژادها مشاهده شده و یکی از شایعترین بیماریهای مزمن التهابی است [۳]. حدود ۰/۵ تا ۱ درصد از افراد جهان به این بیماری مبتلا هستند. با افزایش سن نیز، میزان ابتلا به آن افزایش می‌یابد، طوری که اوج ابتلا به آن بین دهه‌های پنج و هفت زندگی است. همانند سایر بیماریهای خودایمن میزان شیوع آن در بین زنان، حدود ۲/۵ برابر مردان می‌باشد [۴،۱].

RA یک بیماری هتروژن است و تشخیص دقیق آن در مراحل اولیه بیماری ممکن نمی‌باشد و از آنجا که شاخصهای تشخیصی بیماری RA با بیماریهای دیگری نیز مشترک است، ژنتیک مولکولی و کاربرد آن، می‌تواند در تشخیص بموقع و دقیق بیماری، بسیار مؤثر باشد [۶،۵]. درمان بموقع و تشخیص در مراحل اولیه بیماری، می‌تواند باعث محدود شدن علائم و عوارض بیماری و هزینه‌های ناشی از آن شود [۱].

تلاشهای تحقیقاتی نشان داده‌اند که فاکتورهای ایمنی‌شناختی و ژنتیکی در کنار عوامل محیطی، نقش عمده‌ای را در آسیب‌زایی بیماری بازی می‌کنند [۱].

به نظر می‌رسد شروع بیماری در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به بیماری هستند با برخی آنتی‌ژنهای خاصی که منجر به تحریک لنفوسیت‌های T وابسته به ملکولهای کمپلکس سازگاری نسجی<sup>۳</sup> MHC خاصی می‌شوند، مرتبط باشد [۴]. با مطالعات انجام شده روی دوقلوها، نقش این مجموعه ژنی حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده شده است [۷،۸]، ریسک ژنتیکی باقیمانده مربوط به تعداد بسیاری لوکوس‌های دیگر است که هر لوکوس بتنهایی نسبت به ژنهای مجموعه MHC نقش بسیار کمتری را داراست [۸].

بر اساس تحقیقات انجام شده نیز، شواهدی مبنی بر ارتباط ژنهای متعددی از HLA با بیماری RA دیده می‌شود [۹]، نقش ناحیه HLA کلاس دو نیز در بروز بیماری RA مورد تحقیق و بررسی قرار دارد [۴،۱۰]. سه ملکول HLA-DQ، HLA-DP و HLA-DR که به ترتیب به‌وسیله<sup>۱۰</sup> الل‌های DPA1 و DPB1، DQA1 و DQB1 و DRB1 در این ناحیه کد می‌شوند

4. Polymorphism

5. Linkage Disequilibrium

6. Haplotype

7. Stastny

8. Wakitan

9. Sattar

10. Alsaeid

1. Monozygote

2. Dizygote

3. Major Histocompatibility Complex (MHC)

## ۲-۲- تعیین نوع HLA-DQB۱

از هر فرد در هر دو گروه، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و در داخل لوله‌های حاوی ده درصد EDTA ریخته شد، سپس DNA به روش غیرآنزیمی سالتینگ اوت<sup>۶</sup> و با استفاده از کیت بیوژن (مشهد- ایران) استخراج گردید [۳۰].

در این تحقیق برای تعیین توالی ال‌های مختلف ژن HLA-DQB۱ از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی (PCR-SSP)<sup>۷</sup> استفاده شد. روش PCR-SSP در تعیین HLA روشی آسان، سریع، حساس و دقیق است. این تکنیک برای تعداد نسبتاً کم نمونه نیز کاربرد دارد. این روش به دلیل ساده، سریع و کم هزینه بودن، در شرایط حیاتی و ضروری مثل پیوند اعضا و تشخیص بیماریها کاربرد بسیاری دارد. PCR با این روش به منظور تعیین تنوع ژنتیکی با دقت بالا انجام می‌شود. در این روش هر جفت پرایمر قادر به شناسایی توالی اختصاصی مربوط به خود می‌باشند. در این روش از چند سری پرایمر استفاده می‌گردد که هر سری برای ال خاصی اختصاصی است و در واکنش PCR، باعث تکثیر آن ال خاص می‌شود. این پرایمرها را اولین بار آلدنر<sup>۸</sup> و اولرپ<sup>۹</sup> در سال ۱۹۹۴ طراحی کردند [۳۱]. زیرگروه HLA-DQB۱\*۰۵۰۱ ال مرجع می‌باشد و توالیهای سایر ال‌ها بر اساس تغییرات در حد چند نوکلئوتید در این توالی مرجع می‌باشند (پلی مورفیسم ژنی). شماره دستیابی توالی ژن HLA-DQB۱\*۰۵۰۱ در سایت NCBI NCBI به شرح زیر است:

Human HLA-DQB۱\*۰۵۰۱: L۳۴۱۰۱ (Hasting software) (نگارش ۳/۰۲ کمپانی Hasting) مجدداً پرایمرها با توالیهای مورد نظر کنترل شدند.

در این روش ۷ ال از ال‌های ژن HLA-DQB۱ به وسیله پرایمرهای اختصاصی در ۸ واکنش متمایز PCR قابل شناسایی است. ال‌های قابل شناسایی در این روش ال‌های HLA-DQB۱\*۰۳۰۵ - \*۰۳۰۱ - \*۰۲۰۱ - \*۰۶۰۹ - \*۰۶۰۱ - \*۰۵۰۴ - \*۰۵۰۱ می‌باشند. ال‌های DQB۱ که بر اساس خصوصیات سرم‌شناسی DQ۴، DQ۵ و DQ۶ نامیده می‌شوند هر کدام با یک واکنش PCR و ال‌های DQ۲، DQ۷، DQ۸ و DQ۹ هر کدام با دو واکنش PCR مجزا از هم، قابل تکثیر می‌باشند. برای مثال افراد ثبت از نظر دارا بودن ال DQ۲ در دو واکنش PCR مربوط به ال‌های DQ۲،۸ و DQ۲ باید دارای باند باشند [۳۲] [جدول ۱ و ۲].

HLA-DR۱، HLA-DR۴ و HLA-DR۱۰ با بیماری RA به اثبات رسیده است و بین تمام این ال‌های مرتبط با بیماری، ال DRB۱\*۰۴۰۱ بیشترین و شدیدترین ارتباط را با بیماری دارد [۲۷].

تمام ال‌های HLA-DRB۱ ای مرتبط با بیماری، دارای ساختار مولکولی مشابهی تحت عنوان اپی‌توپ مشترک<sup>۱</sup> (SE) هستند که در سال ۱۹۸۷ به وسیله گریگرسن<sup>۲</sup> پیشنهاد شد [۲۸]. در کنار ال‌های مذکور، ال‌های HLA-DRB۱\*۰۴۰۲، \*۱۳۰۱، \*۱۳۰۲ دارای نقیشت حفاظت‌کنندگی در مقابل بیماری می‌باشند [۲۷ و ۲۹].

در هر حال مطالعات مختلف در جمعیت‌های گوناگون در زمینه HLA-DRB۱ و استعداد ابتلا به بیماری RA انجام شده است. شواهدی نیز مبنی بر تأثیر ال‌های HLA-DQ بر بروز بیماری RA وجود دارد [۲۷]، از آنجا که در جمعیت ایرانی تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با HLA-DQB۱ انجام نشده، لذا در مطالعه حاضر میزان فراوانی ال‌های ژن HLA-DQB۱ در بیماران مبتلا به روماتوئید آرتریتیس و مقایسه آن با جمعیت سالم در جمعیت ایرانی - خراسانی بررسی شد. با یافتن ارتباطی معنی‌دار بین زیرگروه خاصی از ال HLA-DQB۱ با بیماری روماتوئید آرتریتیس می‌توان، داده به دست آمده را به عنوان فاکتوری تشخیصی، محسوب و از آن در تشخیص بیماری و یا پیش‌آگهی در مورد میزان و شدت بیماری استفاده کرد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- نمونه‌گیری

این مطالعه در سال ۸۳-۱۳۸۲ در پژوهشکده بوعلی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده و از نوع مورد-شاهد<sup>۳</sup> بوده است. جامعه مورد بررسی، متشکل از ۱۱۱ نفر بود که از این تعداد ۲۵ نفر مبتلا به روماتوئید آرتریتیس بودند که به بخش روماتولوژی بیمارستان قائم مشهد مراجعه کرده بودند. در مقابل ۸۶ نفر به عنوان کنترل انتخاب شدند این افراد به RA و سایر بیماریهای التهابی مبتلا نبوده و از نظر سن و جنس با گروه مورد مطالعه هماهنگ بودند. افراد مورد مطالعه زیر نظر و با تشخیص پزشک متخصص روماتولوژی و با توجه به شاخصهای جهانی استاندارد تشخیص RA انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه از نژاد ایرانی - خراسانی بودند و روش نمونه‌گیری، نمونه‌گیری غیراحتمالی<sup>۴</sup> و به طریق نمونه‌گیری آسان<sup>۵</sup> بود.

1. Shared Epitope
2. Gregersen
3. Case-Control study
4. Non probability Sampling
5. Convenient Sampling

6. Salting out
7. PCR Sequence Specific Primer
8. Aldner
9. Olerup

جدول ۱ مشخصات پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR-SSP برای تعیین الل‌های ژن HLA-DQB

شماره	نام پرایمر	توالی 5' → 3'	Tm (°C)	طول قطعه
۱	۵۰۱LL	GAC-GGA-GCG-CGT-CCG-GGG	۶۶	۱۸
۲	۳۱۵	TGC-AGG-ATC-CCG-CGG-TAC-G	۶۴	۱۹
۳	۵۰۹LL	GGG-ACG-GAG-CGC-GTG-CGT-TA	۶۸	۲۰
۴	۳۱۶	CTG-CAA-GAT-CCC-GCG-GAA-CG	۶۶	۲۰
۵	۵۰۸LL	GGG-ACG-GAG-CGC-GTG-CGT-CT	۷۰	۲۰
۶	۳۰۶L	TGC-AGG-ATC-CCG-CGG-TAC-C	۶۴	۱۹
۷	۵۰۷	GTG-CGT-CTT-GTG-AGC-AGA-AG	۶۲	۲۰
۸	۳۰۷L	TGC-AAG-GTC-GTG-CGG-AGC-T	۶۲	۱۹
۹	۵۱۵LL	GTG-CTA-CTT-CAC-CAA-CGG-GAC-C	۷۰	۲۲
۱۰	۳۰۸L	GCT-GTT-CCA-GTA-CTC-GGC-GG	۶۶	۲۰
۱۱	۳۰۹LL	CCA-GTA-CTC-GGC-GTC-AGG-CG	۶۸	۲۰
۱۲	۳۰۹LV	CAG-TAC-TCG-GCG-GCA-GGC-G	۶۶	۱۹
۱۳	۳۰۹L	CAG-TAC-TCG-GCG-TCA-GGC-G	۶۴	۱۹
۱۴	۵۱۶	GCC-GCT-GGG-GCC-GCC-TGA	۶۶	۱۸
۱۵	۳۱۱LL	CTG-GTA-GTT-GTG-TCT-GCA-TAC-G	۶۶	۲۲

جدول ۲ مشخصات قطعات تکثیری با پرایمرهای مختلف برای الل‌های مختلف خانواده HLA-DQB1

طول قطعه محصول (جفت‌باز)	ژنوتیپ HLA-DQB <sub>1</sub>	الل HLA-DQB <sub>1</sub>	نام پرایمرها	مخلوط پرایمری برای
۲۰۶	۰۲۰۱	DQ۲	۵۰۷,۳۰۷L	DQ۲ alleles
۲۱۱	۰۴۰۱,۰۴۰۲	DQ۴	۵۱۵LL,۳۱۱LL	DQ۴ alleles
۲۱۶	۰۵۰۱-۰۵۰۴	DQ۵	۵۰۱LL,۳۱۵	DQ۵ alleles
۲۱۸,۲۱۹	۰۶۰۱-۰۶۰۹	DQ۶	۵۰۹LL,۵۰۸LL,۳۱۶,۳۰۶L	DQ۶ alleles
۱۲۶	۰۳۰۱,۰۳۰۴	DQ۷	۵۰۹LL,۳۰۹LL,۳۰۹LV	DQ۷ alleles
۱۳۲,۱۴۷	۰۲۰۱,۰۳۰۲,۰۳۰۵	DQ۲,۸	۵۰۸LL,۵۱۵LL,۳۰۸L	DQ۲,۸ alleles
۱۲۵,۱۴۰	۰۳۰۲,۰۳۰۳,۰۳۰۵	DQ۸,۹	۵۰۸LL,۵۱۵LL,۳۰۹L	DQ۸,۹ alleles
۱۲۳	۰۳۰۱,۰۳۰۳	DQ۷,۹	۵۱۶,۳۰۷L	DQ۷,۹ alleles

### ۲-۳- آنالیزهای آماری

تحلیل آماری داده‌ها به وسیله تستهای آماری مجذور کای و فیشر<sup>۲</sup> انجام گرفت. نتایجی که P-Value در آنها کمتر از ۰/۰۵ محاسبه گردید، از نظر آماری دارای ارزش می‌باشند. اندازه‌گیری میزان ارتباط الل‌های HLA-DQB<sub>1</sub> با بیماری روماتوئید آرتریتیس از نظر آماری، با تعیین میزان مخاطره نسبی (RR)<sup>۳</sup> که در سال ۱۹۹۵، ولف<sup>۴</sup> مطرح کرد نیز انجام گرفت [۳۳].

در کل در این تحقیق از ۱۵ پرایمر برای شناسایی الل‌های ژن HLA-DQB<sub>1</sub> استفاده شد و در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شدند (IMAGO, B&L system). در این مطالعه برای حذف جوابهای منفی کاذب به علت عدم انجام صحیح PCR، از کنترل داخلی β-actin در هر واکنش PCR استفاده شد. این ژن از ژن‌های هاوس کپینگ<sup>۱</sup> است که در همه سلولها بیان می‌شود.

[شکل ۱ نمونه‌ای از PCR مربوط به الل‌های DQ۲ و DQ۸ و ارزیابی آن بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با کنترل داخلی β-actin می‌باشد].

2. Chi square and Fisher's exact

3. Relative Risk

4. Woolf

1. Housekeeping

## ۳- نتایج

با استفاده از آزمون مجذور کای، اختلاف میانگین بین الل‌ها در دو گروه کنترل و بیمار، بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، الل‌های (\*۰۵۰۱- \*۰۵۰۴) HLA-DQ۵ و (\*۰۳۰۲- \*۰۳۰۵) HLA-DQ۸ در بیماران مبتلا به RA نسبت به افراد سالم با اختلاف معنی‌داری، بیشتر دیده شدند و P-value در آنها به ترتیب (P=۰/۰۳۳) و (P=۰/۰۰۷) شد.

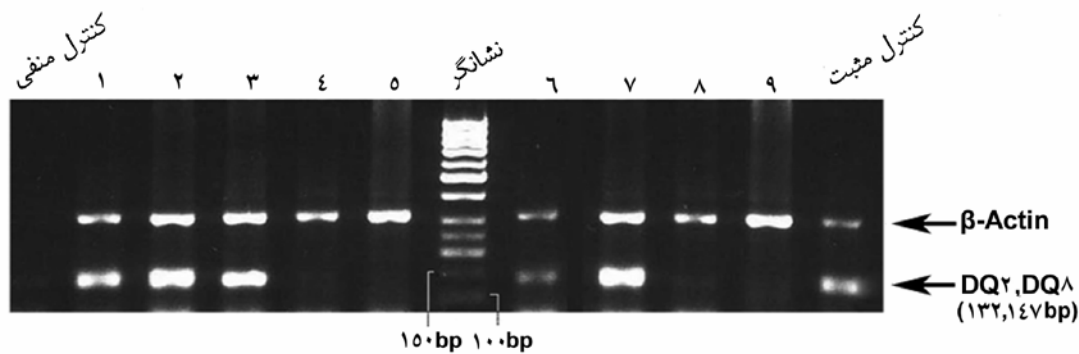
همچنین RR برای این الل‌ها به ترتیب ۲/۶۴ برای الل DQ۵

و ۵/۱۱۶ برای الل DQ۸ محاسبه شد. در این حالت  $RR > 1$  است که این نیز نشان‌دهنده نقش مثبت این الل‌ها در بروز بیماری است [جدول ۳].

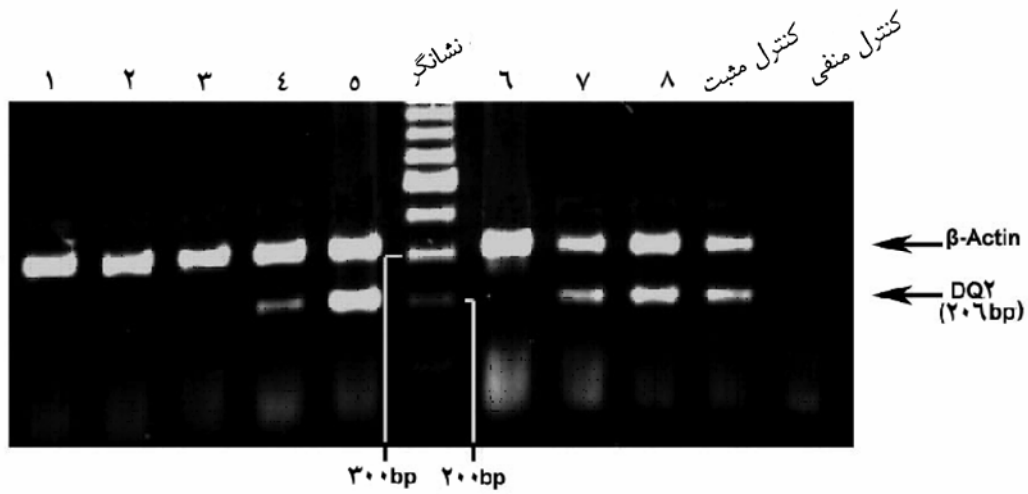
تفاوت چشمگیری در فراوانی سایر الل‌ها بین دو گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد [شکل‌های ۲ تا ۸ نمونه‌ای از الکتروفورز مربوط به الل‌های DQ۲، DQ۴، DQ۵، DQ۶، DQ۷، ۹، DQ۸، ۹، DQ۹ می‌باشد].

جدول ۳ مقایسه فراوانی الل‌های ژن HLA-DQB1 در دو گروه کنترل و بیمار و نتایج آنالیز آماری آنها

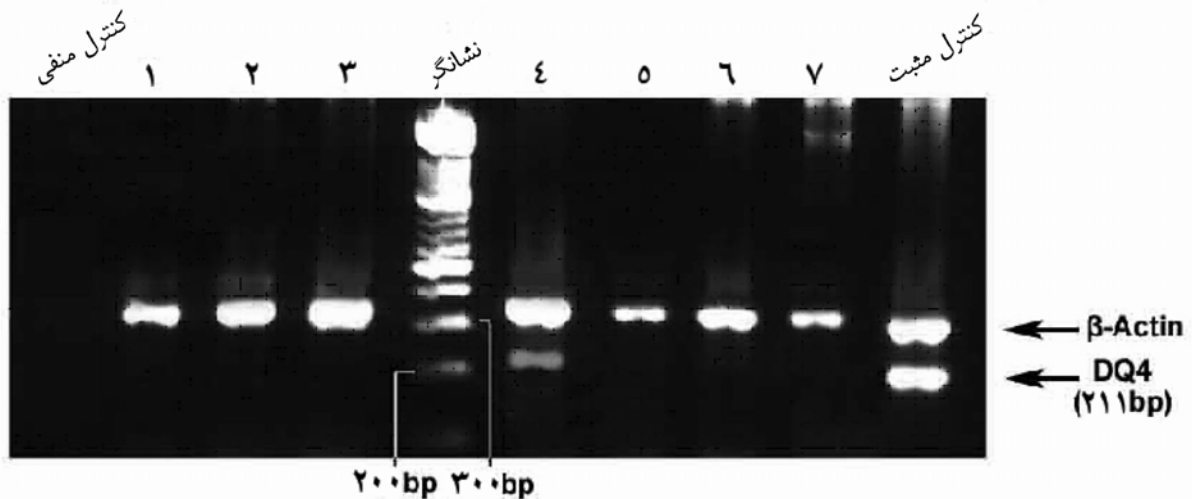
الل‌ها	افراد مبتلا به RA N= ۲۵	افراد سالم N= ۸۶	مقدار P
DQ۲ (*۰۲۰۱)	۷ (%۲۸)	۳۳ (%۳۸/۴)	۰/۳۹۶ (RR=۰/۶۵۶)
DQ۴ (*۰۴۰۱, *۰۴۰۲)	۰ (%۰)	۳ (%۳/۵)	۰/۳۴۴ (RR=۰/۹۶۵)
DQ۵ (*۰۵۰۱- *۰۵۰۴)	۱۴ (%۵۶)	۲۷ (%۳۱/۴)	۰/۰۳۳ (RR=۲/۶۳۶)
DQ۶ (*۰۶۰۱- *۰۶۰۹)	۵ (%۲۰)	۲۷ (%۳۱/۴)	۰/۳۱۵ (RR=۰/۵۷۷)
DQ۷ (*۰۳۰۱, *۰۳۰۴)	۹ (%۳۶)	۳۲ (%۳۷/۲)	۰/۹۹۷ (RR=۰/۹۹۸)
DQ۸ (*۰۳۰۱, *۰۳۰۵)	۶ (%۲۴)	۵ (%۵/۸)	۰/۰۰۷ (RR=۵/۱۱۶)
DQ۹ (*۰۳۰۳)	۰ (%۰)	۷ (%۸/۱)	۰/۱۴۱ (RR=۰/۹۱۹)



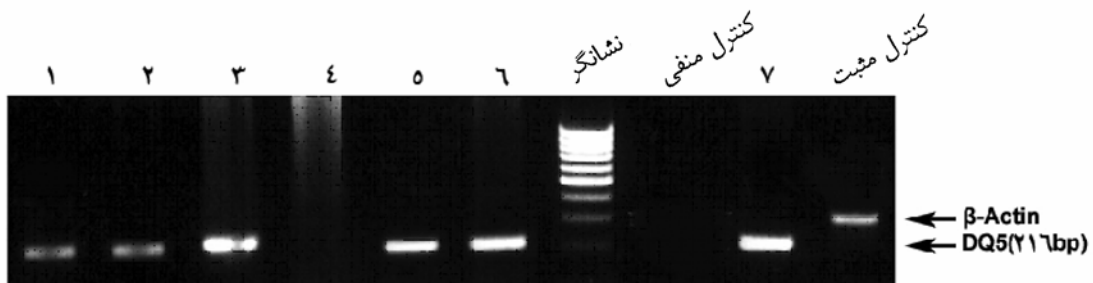
شکل ۱ ارزیابی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با کنترل داخلی β-actin (نمونه‌ای از PCR مربوط به الل‌های DQ۲ و DQ۸). از چپ به راست: کنترل منفی. ردیف ۱-۳: نمونه‌های مثبت. ردیف ۴-۵: نمونه‌های منفی. مارکر. ردیف ۶-۷: نمونه‌های مثبت. ردیف ۸-۹: نمونه‌های منفی. کنترل مثبت



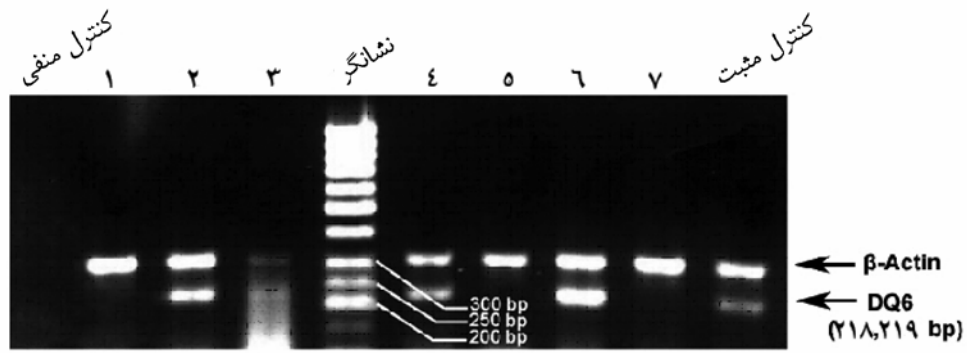
شکل ۲ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های  $\beta$ -اکتین و DQ2 در این شکل نمونه‌های ردیف‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ مثبت و ردیف‌های ۱، ۲، ۳ و ۶ منفی می‌باشند.



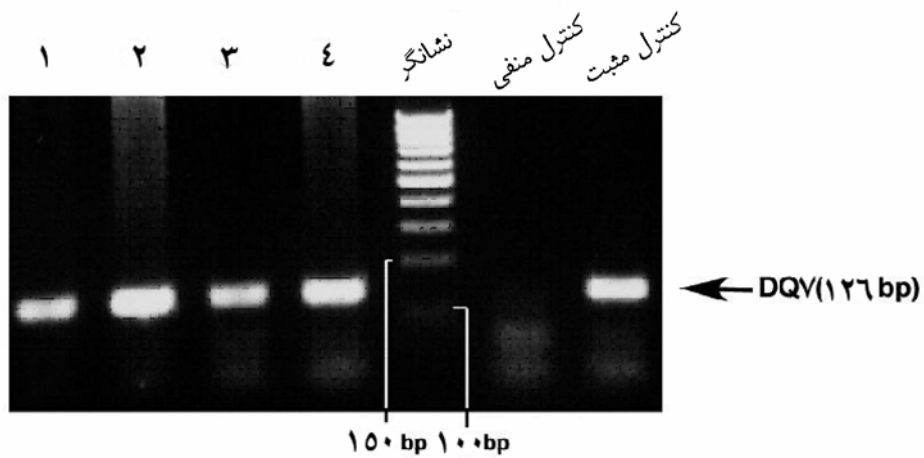
شکل ۳ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های  $\beta$ -اکتین و DQ4 در این شکل ردیف ۴ مثبت و ردیف‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶ و ۷ منفی می‌باشند.



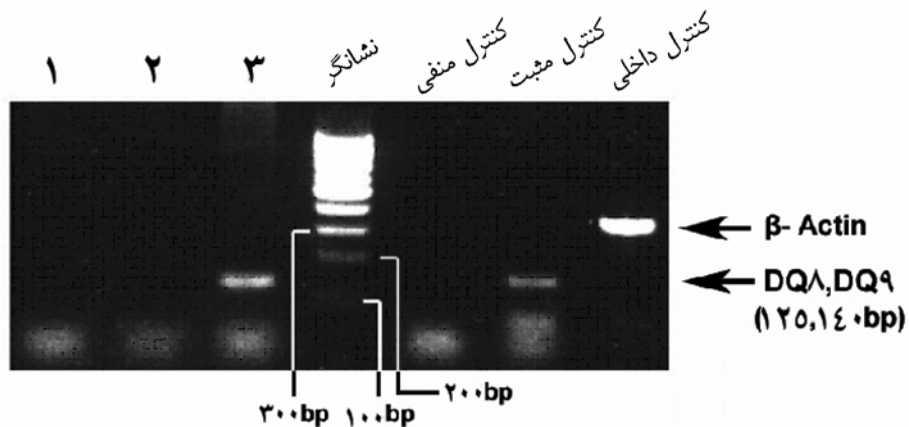
شکل ۴ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن DQ5 در این شکل نمونه‌های ردیف‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶ و ۷ مثبت و نمونه ۴ منفی می‌باشد.



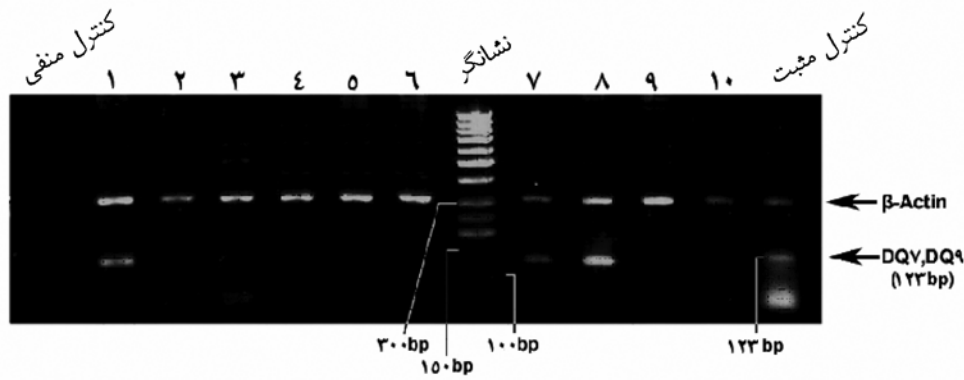
شکل ۵ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های  $\beta$ -اکتین و DQ۶ در این شکل نمونه‌های ردیف‌های ۲، ۳، ۴ و ۶ مثبت و نمونه‌های ۱، ۵ و ۷ منفی می‌باشند.



شکل ۶ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن DQ۷ در این شکل نمونه‌های ردیف‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ مثبت می‌باشند.



شکل ۷ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های  $\beta$ -اکتین و DQ۸ و DQ۹ در این شکل نمونه ردیف ۳ مثبت و نمونه‌های ۱ و ۲ منفی می‌باشند.



شکل ۸ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن‌های  $\beta$ -کتین و DQV و DQ9 در این شکل نمونه‌های ردیف‌های ۱، ۷ و مثبت و نمونه‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹ و ۱۰ منفی می‌باشند.

گذاشته شود.

بر اساس مطالعاتی که زانلی<sup>۲</sup> و همکاران بر روی موشهای آزمایشگاهی انجام داده‌اند، مشخص شده است که برخی الل‌های HLA-DQ قادر به افزایش ریسک ابتلا به بیماری روماتوئید آرتریتیس می‌باشند، در مقابل الل‌های HLA-DR نقش حفاظت‌کنندگی و یا مستعدکنندگی را در مقابل بیماری بازی می‌کنند [۲۹].

امروزه مدرکی دال بر وجود نقش کلیدی الل‌های HLA-DQ و HLA-DP به عنوان عوامل ژنتیکی مؤثر در بروز RA، وجود ندارد و برای اثبات این نظریه و اثبات نقش این الل‌ها در بروز بیماری، به مطالعات و تحقیقات گسترده‌تری نیاز است [۳۷].

در این پژوهش، ارتباط الل‌های ژن HLA-DQB1 با بیماری RA بررسی شد، بر مبنای داده‌های آماری به‌دست آمده بین الل‌های DQ2، DQ4، DQ6، DQ7 و DQ9 در دو گروه کنترل و بیمار، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

همان‌گونه که در نتایج آمده، فراوانی الل‌های DQ5 (\*۰۵۰۱، \*۰۵۰۴) و DQ8 (\*۰۳۰۲، \*۰۳۰۵) سالم و بیمار دارای اختلاف معنی‌دار است و این بدان معناست که الل‌های DQ5 و DQ8 می‌توانند به عنوان یکی از عوامل خطر ژنتیکی مؤثر در بروز بیماری محسوب شوند. با مقایسه P-value و RR به‌دست آمده از این دو الل با یکدیگر، نقش مؤثرتر الل DQ8 در بروز بیماری مشاهده می‌شود، چرا که میزان مخاطره نسبی نیز برای الل DQ8 بیشتر از DQ5 می‌باشد، یعنی افراد

با استفاده از آزمون مجذور کای، اختلاف میان فرکانس ژنوتیپ‌های موجود در دو گروه کنترل و بیمار نیز بررسی شد، در این آزمون، P-value برای ژنوتیپ DQ5/DQ8، کمتر از ۰/۰۵ و P=۰/۰۰۰ شد، به این معنی که برای این ژنوتیپ بین دو گروه سالم و بیمار با احتمال ۹۹/۹۹ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد و ژنوتیپ DQ5/DQ8 در بیماران به میزان بسیار بیشتری دیده می‌شود و افراد حامل این ژنوتیپ به میزان بسیار بالایی در معرض ابتلا به بیماری قرار دارند [جدول ۴].

جدول ۴ مقایسه فراوانی ژنوتیپ DQ5/DQ8 در دو گروه کنترل و بیمار

گروه‌های مورد بررسی	افراد دارای ژنوتیپ DQ5/DQ8	درصد (P=۰,۰۰)
افراد مبتلا به RA N= ۲۵	۴	٪۱۶
افراد سالم N= ۸۶	۰	٪۰

## ۴- بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نقش کلیدی ملکول‌های HLA در عرضه آنتی‌ژن و در بروز بیماریهای خودایمن، ژن‌های این ناحیه در بروز بیماری و افزایش یا کاهش استعداد ابتلا به بیماری در افراد، نقش مهمی را بازی می‌کنند [۳۶،۳۵،۳۴]. تعدد الل‌های این ناحیه ژنی، موجب می‌گردد تا روی واکنشهای اتصال آنتی‌ژن<sup>۱</sup> و تداخل با TCR اثر



حامل DQ۸ در معرض خطر ابتلای بالاتری نسبت به افراد حامل DQ۵ قرار دارند.

با توجه به RR محاسبه شده برای ال DQ۷، که تقریباً عددی مساوی ۱ می‌باشد، احتمال خطر ابتلا به بیماری در افراد حامل این ال مشابه افراد غیر حامل می‌باشد به عبارتی دیگر رابطه‌ای بین این ژن و بیماری RA در این مطالعه دیده نمی‌شود (RR=۰/۹۹۸).

نتیجه جالب توجه در این تحقیق، فراوانی بالای ژنوتیپ DQ۵-DQ۸ در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل بود (۱۶ درصد در برابر صفر درصد). افراد حامل این ژنوتیپ نسبت به سایر افراد در معرض ابتلای بسیار بیشتری قرار دارند. ژنوتیپ DQ۵-DQ۵ نیز در گروه بیمار با احتمال ۹۰ درصد اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان می‌دهد.

لازم به ذکر است با توجه به P-value به دست آمده از ژنوتیپ‌های هتروزیگوت DQ۸-DQ۲ و DQ۶-DQ۸، بین دو گروه کنترل و بیمار اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود یعنی همانند سایر ژنوتیپ‌ها، این ژنوتیپ‌ها نیز بر خلاف دارا بودن ال DQ۸ با بیماری RA ارتباطی را نشان نمی‌دهند، این امر می‌تواند دلیلی بر وجود نقش حفاظتی برای ال‌های DQ۲ و DQ۶ در مقابل بیماری و پوشانده شدن اثر ال DQ۸ به وسیله آنها باشد. با افزایش نمونه‌های مورد آزمایش، در موارد فوق می‌توان به نتایج قاطعتری دست یافت.

در مطالعاتی که تاکنون در سطح جهان انجام شده نیز نشان داده شده که ال DQ۵ به همراه ال‌های DR۱ و DR۱۰ در بروز بیماری RA مؤثر می‌باشد، ولی تأثیر آن بر بروز بیماری کمتر از HLA-DQB۱\*۰۳(DQ۳) است [۳۸،۱۲].

نقش کلیدی ملکولهای HLA-DQ در بروز بیماری RA به وسیله زانلی و همکاران مطرح و نشان داده شد که ملکولهای HLA-DQ۵ و HLA-DQ۸ می‌توانند در بروز بیماری دخیل باشند [۲۷].

در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده، در ژاپنی‌ها و بعضی جمعیت‌های مدیترانه‌ای دیده شده که هاپلوتایپ DQ۴، DRB۱\*۰۴۰۵ در بیماران RA افزایش یافته است [۲۷].

در مطالعه‌ای که روی جمعیتی از بیماران در یونان انجام شد، علاوه بر ال HLA-DRB۱\*۱۰۰۱، هاپلوتایپ HLA-DRB۱\*۰۳۰۲، DQB۱\*۰۴۰۴، DRB۱\*۰۴۰۴ را نیز در افراد مبتلا بیشتر یافتند [۳۹]. همچنین Seidl و همکاران در مطالعه‌ای روی آلمان‌ها گزارش کردند که افراد دارای هاپلوتایپ‌های (DQ۵) DQA۱\*۰۱/DQB۱\*۰۵۰۱ و (DQ۳) DQA۱\*۰۳/DQB۱\*۰۳ در معرض ابتلای بالاتری نسبت به

سایر افراد قرار دارند [۴۰].

وارگا<sup>۱</sup> و همکاران نیز در بیماران مجاری‌هاپلوتایپ DQB۱\*۰۳۰۲، DRB۱\*۰۴۰۳ را به میزان بیشتری مشاهده کردند [۴۱].

در تحقیق انجام شده بر روی استرالیایی‌ها نیز، علاوه بر ال HLA-B۲۷، ال‌های (DQ۸) DQB۱\*۰۳۰۲ و HLA-DR۴ را در ارتباط با بیماری مشاهده کردند [۴۲].

همانگونه که مشاهده می‌شود به دلیل خاصیت پیوستگی ترجیحی بالایی که بین ال‌های HLA-DRB۱ و HLA-DQB۱ وجود دارد، همواره ال‌های خاصی از هر کدام در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند.

در تعدادی از تحقیقاتی که تاکنون انجام شده، گزارش شده که در کنار ال (DQ۸) DQB۱\*۰۳۰۲ از HLA-DQB۱، ال (DQ۷) DQB۱\*۰۳۰۱ نیز با بیماری RA دارای ارتباط نزدیکی است [۴۳-۴۵]، ولی در برخی دیگر از مطالعات برای ال DQ۷ در بروز بیماری RA نقشی قائل نشده‌اند [۴۶]. همانگونه که ذکر شد در تحقیق اخیر نیز، ارتباطی بین این ال و بیماری مشاهده نشد.

به‌طور کلی آزمایشات بر روی موشهای آزمایشگاهی ترانس‌ژن شده نشان می‌دهد که موشهایی که ملکول DQ۸ را بیان می‌کنند مستعد ابتلا به بیماری هستند و در مقابل موش‌های ترانس‌ژن شده با ژن DQ۶ نسبت به ابتلا به بیماری مقاوم هستند و این یعنی ملکول DQ۶، می‌تواند در برابر بیماری نقش محافظت‌کنندگی را بازی کند [۴۷-۴۹].

با آزمایشات بیشتر می‌توان نقش ال یا ال‌های خاصی از HLA-DQB۱ را همانند HLA-DRB۱ در بروز بیماری به اثبات رساند و از آن در تشخیص و یا پیش‌آگهی بیماری استفاده کرد.

توجه به مطالب ذکر شده و نتایج به دست آمده، می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که افراد حامل آنتی‌ژن‌های DQ۸ و DQ۵ و ژنوتیپ‌های DQ۵/۵ و DQ۵/۸ نسبت به بیماری در معرض ابتلای بیشتری قرار دارند و آنتی‌ژن‌های DQ۸ و DQ۵ در بروز بیماری روماتوئید آرتریتس نقش مهمی را ایفا می‌کنند. نتایج به دست آمده در این تحقیق فرضیه‌های موجود را تأیید می‌کند. می‌توان با افزایش نمونه‌های مورد آزمایش و همچنین طراحی پرایمرهای بیشتر به منظور افزایش حساسیت تکنیک HLA-Typing، یافته‌های فوق را تأیید کرد.

## ۵- منابع

- [1] Klippel J.H., 2003, *Primer on the Rheumatoid Diseases*, 12<sup>th</sup> edition, Atlanta, Georgia: Arthritis Foundation; 2003.
- [2] Oliver W., Winchester R., The germline and somatic genetic basis for rheumatoid arthritis, *Genes Genet Autoimmun*, 1999, Pp: 166-193.
- [3] Symmons D.P., Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome, *Best Pract Res Rheumatol*, 2002, 16(5): 707-22.
- [4] Buch M., Emery P., The aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Hosp Pharm*, 2002, Vol. 9.
- [5] zanelli E., Breedveld F.C., de Vries R.R.P., HLA association with autoimmune disease: a failure to protect?, *Rheumatology*, 2000, 39: 1060-6.
- [6] Weyand C.M., Goronzy J.J., Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res*, 2000, 2: 212-6.
- [7] Cornelis F., Faure S., Martinez M., Prudhomme J.F., Fritz P., Dib C., et al., New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10746-50.
- [8] Yen J.H., Moore B.E., Nakajima T., Scholl D., Schaid D.J., Weyand C.M., et al., Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis, *J Exp Med*, 2001, 193: 1159-67.
- [9] Lie B.A., Thorsby E., Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune disease, *Curt Opin Immunol*, 2005, 17: 526-31.
- [10] Silman A.J., Pearson J.E., Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res*, 2002, 4(3): 265-72.
- [11] Van der Horst-Bruinsma I.E., Visser H., Breedveld F.C., Verduyn W., de Vries R.R.P., Zanelli E., HLA-DQ-Associated predisposition to and dominant HLA-DR-Associated protection against rheumatoid arthritis, *Human Immunol*, 1999, 60: 152-8.
- [12] Zanelli E., Huizinga T.W.J., Guerne P.A., Vischer T.L., Tiercy J.M., Verduyn W., Schreuder G.M.T., Breedveld F.C., de Vries R.R.P., An extended HLA-DQ-DR haplotype rather than DRB1 alone contributes to RA predisposition, *Immunogenetics*, 1998, 48: 394-401.
- [13] Stastny P., Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis, *J Clin Invest*, 1976, 57: 1148.
- [14] Stastny P., Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis, *N Engl J Med*, 1978, 298:869-71.
- [15] Yelamos J., Garcia-Lozano J.R., Moreno I., Aguilera I., Gonzales M.F., Garcia A., Nunez-Roldan A., Sanchez B., Association of HLA-DR4-DW15 (DRB1\*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population, *Arthritis Rheum*, 1993, 36:811.
- [16] Nepom G.T., Byers P., Seyfried C., Healey L.A., Wilski K.R., Stage D., Nepom B.S., HLA genes associated with rheumatoid arthritis: identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes, *Arthritis Rheum*, 1989, 32:15.
- [17] Wordsworth B.P., Lanchbury J.S.S., Sakkas L.I., Welsh K.I., Panayi G.S., Bell J.I., HLA-DR4 subtype frequency in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the human leukocyte antigen class II region, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 10049.
- [18] Direskeneli S., HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in Turkey, *Human Immunol*, 1996, P. 79.
- [19] Boehm B., Loeliger C., Kuehnl P., Manfras B.,

- Weiss U., Scherbaum W., Association of rheumatoid arthritis with HLA-DRB1\*0401 and DRB1\*0408 alleles but not with DQB1\*0301 allele in German Caucasians, *Human Immunol*, 1996, P. 77.
- [20] Takeuchi F., Nakano K., Matsuta K., Nabeta H., Bannai M., Tanimoto K., Ito K., Positive and negative association of HLA-DR genotypes with Japanese rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol*, 1996, 14: 17.
- [21] Hong G.H., Park M.H., Takeuchi F., Oh M.D., Song Y.W., Nabeta H., Nakano K., Ito K., Park K.S., Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value, *J Rheumatol*, 1996, 23: 1699.
- [22] Taneja V., Giphart M.J., Verduijn W., Naipal A., Malaviya A.N., Mehra N.K., Polymorphism of HLA-DRB-DQA1 and DQB1 in rheumatoid arthritis in Asian Indians: association with DRB1\*0405 and DRB1\*1001, *Human Immunol*, 1996, 46: 35.
- [23] Ruiz-Morales J.A., Vargas-Alarcon G., Flores-Villanueva P.O., Villarreal-Garza C., Hernandez-Pacheco G., Yamamoto-Furusho J.K., et al., HLA-DRB1 alleles encoding the "Shared Epitope" are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the  $\beta$ -chain are protective in Mexican Mestizos, *Human Immunol*, 2004, 65: 262-9.
- [24] Wakitani S., Imoto K., Murata N., Toda Y., Ogawa R., Ochi T., The homozygote of HLA-DRB1\*0901, not its heterozygote, is associated with rheumatoid arthritis in Japanese, *Scand J Rheumatol*, 1998, 27: 381.
- [25] Carthy D., Ollier W., Papasteriades C., Pappas H., Thomson W., A shared HLA-DRB1 sequence confers RA susceptibility in Greeks, *Eur J Immunogenet*, 1993, 20: 391.
- [26] Sattar M.A., Al-Saffar M., Guindi R.T., Suathan T.N., Behbehani K., Association between HLA-DR antigens and rheumatoid arthritis in Arabs, *Ann Rheum Dis*, 1990, 49: 147-9.
- [27] Zanelli E., Breedvald F.C., de Vries R.R.P., HLA class II association with rheumatoid arthritis: Facts and interpretations, *Human Immunol*, 2000, 61: 1254-61.
- [28] Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J., The shared epitope hypothesis- an approach to understanding the molecular genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, *Arthritis Rheum*, 1987, 30: 1205-13.
- [29] Zanelli E., Gonzales M.A., David C.S., Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis?, *Immunol Today*, 1995, 16: 274.
- [30] Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acid Res*, 1988, 16(3): 1215.
- [31] Olerup O., Aldner A., Fogdell A., HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours, *Tissue antigens*, 1993, 41:119.
- [32] Cannava A.A., Olerup O., HLA-DQB1 low resolution typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP), *Eur J Immunogenet*, 1994, 21: 447-55.
- [33] Woolf B., On estimating the relation between blood group and disease, *Ann Hum Genet*, 1995, 19: 251-3.
- [34] Reveille J.D., The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol*, 1998, 10: 187-200.
- [35] Nepom G.T., Major histocompatibility complex-directed susceptibility to rheumatoid arthritis, *Adv Immunol*, 1999, 68: 315-32.
- [36] Weyand C.M., Goronzy J.J., Association of MHC and rheumatoid arthritis HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res*, 2000, 2: 212-6.

- [37] Perdriger A., Do the HLA-DQ and DP genes play a role in rheumatoid arthritis?, *Joint Bone Spine*, 2001, 68: 12-8.
- [38] Harney S.M.J., Newton J.L., Wordsworth B.P., Molecular genetics of rheumatoid arthritis, *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3: 280-5.
- [39] Stavropoulos-Giokas C., Spyropoulou-Vlachou M., Doxiadis I.I.N., Kaklamanis F., Kaklamani E., The shared epitope versus DR/DQ haplotype hypothesis in rheumatoid arthritis in Greeks, *Human Immunol*, 1999, 60: S48.
- [40] Seidl C., Korbitzer J., Badenhoop K., Seifried E., Hoelzer D., Zanelli E., Kaltwasser J.P., Protection against severe disease is conferred by DERA-bearing HLA-DRB1 allele among HLA-DQ3 and HLA-DQ5 positive rheumatoid arthritis patients, *Human Immunol*, 2001, 62: 523-9.
- [41] Varga E., Palkonyai E., Temesvari P., Toth F., Petri I.B., The role of HLA-DRB1\*04 alleles and their association with HLA-DQB genes in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Hungarian patients, *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2003, 50(1): 33-41.
- [42] Sherrit M.A., Tait B., Varney M., Kannan C., Stockman A., Mackay I.R., Muirden K., Bernard C.C.A. Rowley M.J., Immunosusceptibility genes in rheumatoid arthritis, *Human Immunol*, 1996, 32-40.
- [43] Singal D.P., Bensen W.G., Kassam Y.B., HLA-DQ polymorphism in rheumatoid arthritis, *Lancet I*, 1988, p.529.
- [44] Singal D.P., Reid B., Bensen W.G., Kassam Y.B., Adachi J.D., HLA-DQ beta-chain polymorphism in HLA-DR4 haplotypes associated with rheumatoid arthritis, *Lancet*, 1987, ii: 1118-20.
- [45] Wallin J., Carlsson B., Strom H., Moller E., A DR4-associated DR-DQ haplotype is significantly associated with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum*, 1988, 31: 72-9.
- [46] Taneja V., Mehra N.K., Chandershekar A.N., Ahuja R.K., Singh Y.N., Malaviya A.N., HLA-DR4-DQw8, but not DR4-DQw7 haplotypes occur in Indian patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatol Int* 11, 1992, p. 251.
- [47] Morgan M.E., Witteveen H.J., Suttmuller R.P.M., de Vries R.R.P., Toes R.E.M, CD25+ regulatory cells from HLA-DQ8 transgenic mice are capable of modulating collagen-induced arthritis, *Human Immunol*, 2004, 65: 1319-27.
- [48] Taneja V., David C.S., Association of MHC and rheumatoid arthritis: Regulatory role of HLA class II molecules in animal models of RA-studies on transgenic/knockout mice, *Arthritis Res*, 2000, 2(3): 205-7.
- [49] Holmdahl R., Association of MHC and rheumatoid arthritis: Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction, *Arthritis Res*, 2000, 2(3): 203-4.