مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۳، ۱۳۹۹، ۳۹۸-۳۹۰
مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط آلل‌های ژن DLA- DRB1 و درماتیت آتوپیک در سگ

شادی بزرگ‌پناه[۱]، شهرام جمشیدی[۲]، سیدمیلاد واحدی[۲]، لیلا لنکرانی‌مهاجر[۱]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[۳]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

10.22059/jvr.2019.245889.2726

تاریخ دریافت: ۲۳ بهمن ماه ۱۳۹۸، **تاریخ پذیرش:** ۲۵ فروردین ماه ۱۳۹۹

چکیده

زمینهٔ مطالعه: مولکول‌های مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC)، در اتصال به پپتیدهای پادگنی و عرضه آن‌ها به لنفوسیت‌های T نقش مهمی دارند و تنوع آن‌ها با پاسخ‌های ایمنی و خودایمنی مرتبط است. ارتباط ژن کدکننده MHC کلاس ۲ در سگ (DRB1) با برخی بیماری‌های ایمنی سگ نشان داده شده است.

هدف: کشف ارتباط بیماری درماتیت آتوپیک سگ با آلل‌های ژن DLA-DRB1.

روش‌کار: تعداد ۲۰ نمونه خون از سگ‌های مبتلا به درماتیت آتوپیک و ۲۰ نمونه از سگ‌های سالم اخذ شد و پس از استخراج DNA با روش تحلیل HRM فراوانی ژنوتیپ‌های DLA-DRB1 و هتروزیگوتی و هوموزیگوتی آلل‌ها مشخص گردید.

نتایج: براساس تحلیل HRM، نمونه‌ها در ۹ تیپ (A تا I) قرار گرفتند. حضور آلل تیپ D در اگزون ۲ ژن DLA-DRB1 احتمال ابتلا به درماتیت آتوپیک را افزایش می‌دهد (P= ۰/۰۶۴ و Odd ratio=۰/۲۰۶). همچنین هتروزیگوتی ژن DLA-DRB1 سبب افزایش خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک می‌شود (P=۰/۰۹۰ و Odd ratio =۰/۱۵۸).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که برخی آلل‌های ژن DLA-DRB1 می‌توانند در حساسیت یا مقاومت در برابر بیماری درماتیت آتوپیک سگ نقش داشته باشند.

کلمات کلیدی: درماتیت، آتوپیک، مجتمع عمده پذیرش بافتی، سگ، آلل

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: غلامرضا نیکبخت بروجنی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: Nikbakht@ut.ac.ir

مقدمه

درماتیت آتوپیک یک بیماری پوستی آلرژیک و ژنتیکی است که به دلیل تولید ایمونوگلوبولین E علیه برخی از آلرژن‌های محیطی ایجاد می‌شود. در سگ درماتیت آتوپیک یکی از رایج‌ترین اختلالات پوستی توام با خارش و التهاب پوست است. بیشترین میزان شیوع بیماری در سگ‌های شش ماه تا چهار و نیم سال گزارش شده است. عوامل متعددی از جمله جهش‌های ژنتیکی، عملکرد معیوب سد دفاعی پوست، نقایص ایمنی و اختلال در سایتوکاین‌ها و مواد آلرژن در ایجاد این بیماری نقش دارند. علایم بیماری شامل قرمزی لاله گوش، التهاب پوست در اندام‌های حرکتی قدامی، التهاب لب و اطراف دهان و خارش‌های پاسخ دهنده به کورتون می‌باشد (۳،۸،۱۸). درماتیت آتوپیک درمان قطعی ندارد اما می‌تواند به خوبی کنترل شود و نشانه‌های بالینی و آثار سوء بیماری بر کیفیت زندگی بیمار کاهش یابد. داروهای مورد استفاده در این بیماری تنها علایم را تخفیف می‌دهند و شامل داروهای ضد خارش، آنتی‌هیستامین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضد قارچ و گلوکوکورتیکوئیدها هستند (۹).

تمامی مهره‌داران به جز ماهی‌های فاقد آرواره دارای ژن‌های MHC هستند. این ناحیه ژنتیکی در دهه ۱۹۳۰ توسط پیتر آلفرد گرر شناسایی شد. جایگاه ژن‌های MHC در گونه‌های مختلف، متفاوت است چنانکه در انسان بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶، در سگ بر روی بازوی کروموزوم ۶ و در گاو روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ قرار دارد (۱۶،۲۲). خوشه ژنی MHC حاوی سه دسته جایگاه ژنتیکی مستقل است: مولکول‌های دسته I در سطح اغلب سلول‌های هسته‌دار یافت می‌شوند. مولکول‌های دسته II در سطح سلول‌های عرضه‌کننده پادگن شامل لنفوسیت‌های B، ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک قرار می‌گیرند. دسته III نیز پروتئین‌هایی را رمز می‌کند که بسیاری از آن‌ها با عرضه پادگن ارتباط مستقیمی ندارند. نقش ژن‌های MHC عرضه پادگن به سلول‌های حساس است. برای تحریک لنفوسیت‌های T ابتدا باید مولکول پادگن به MHC متصل شود و سپس به پذیرنده اختصاصی لنفوسیت T عرضه گردد (۲۲).

در انسان نقش ژن‌های MHC (HLA) و ارتباط آلل‌های آن با حساسیت به درماتیت آتوپیک به اثبات رسیده است (۱۲). در سگ نیز ارتباط ژن‌های MHC (DLA) با حساسیت به برخی بیماری‌ها از جمله پلی‌میوزیت، مننگوانسفالیت نکروزان، کارسینومای غدد مقعدی، هیپوآدرنوکورتیسیزم، آرتریت روماتوئید و لیشمانیوز نشان داده شده است (۱،۶،۱۲،۱۵،۱۷،۲۳). در انتهای دهه ۱۹۸۰ آنالیزهای مولکولی MHC سگ آغاز شد. اطلاعات اولیه در ارتباط با DLA بر اساس کاوش‌های سلولی، سرولوژیک و ایمنوشیمیایی به دست آمده است. بعدها آنالیزهای مولکولی بر روی این ژن‌ها تشابه بالای آن را با توالی انسانی نشان داد. مطالعه الگوهای ساترن بلات با پروب انسانی نشان داده است که حدود هشت ژن در ناحیه DLA کلاس ۱ و چهار ژن یعنی DRB، DQA و DQB و DRA در ناحیه کلاس ۲ قرار دارند.MHC سگ در حال حاضر هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌است، ولی تحقیقات نشان می‌دهند که ژن DLA-DRB1 با ۶۱ آلل متنوع‌ترین ژن در ناحیه کلاس ۲ است (۲۲).

تاکنون روش‌های گوناگونی جهت بررسی تنوع و ژنوتایپینگ آلل‌های MHC مورد استفاده قرار گرفته است که عبارتند از: روش‌های سرولوژیک، کشت مخلوط لنفوسیت‌ها، PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)، PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism)، توالی‌یابی مستقیم، نسل آتی تعیین توالی (Next Generation Sequencing)، تحلیل هترودوپلکس (Heteroduplex analysis)، استفاده از الیگونو کلئوتیدهای اختصاصی و استفاده از ریزماهواره‌ها. یکی از روش‌های جدید، تحلیل دقیق دمای شکافت (High -HRM Resolution Melting) DNA است. از آنجایی که بر خلاف روش‌های قدیمی بنای این روش بر مقایسه چشمی کاربر نیست، خطای انسانی در آن کمتر است و نتایج معتبری از لحاظ تکرارپذیری و تجدیدپذیری ارائه می‌دهد (۲۰). این مطالعه با هدف بررسی ارتباط آلل‌های ژن DLA-DRB1 با حساسیت سگ‌ها در برابر درماتیت آتوپیک توسط روش HRM صورت گرفته است.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA: در مطالعه حاضر از ۲۰ قلاده سگ مبتلا به درماتیت آتوپیک و ۲۰ قلاده سگ سالم که به بیمارستان دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شده بودند، نمونه خون کامل اخذ گردید و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ذخیره شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. موارد درماتیت آتوپیک طبق دستورالعمل Prélaud و همکاران در سال ۱۹۹۸ تشخیص داده شد (۱۴). DNA نمونه‌های خون به وسیله کیت تجاری i-genomic Blood DNA Extraction Mini Kit شرکت Intron Korea مورد استخراج قرار گرفت. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. اطلاعات مربوط به گروه شاهد و مطالعه در جدول ۱ به طور کامل آمده است.

افزوده‌سازی اگزون دوم DLA-DRB1 جهت آزمون HRM و Melt Curve: افزوده‌سازی اگزون دوم DLA-DRB1 بر اساس مطالعه Vahedi و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد (۲۰). مرحله اول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۴ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)، آغازگرهای DRBF و DRBR3 هرکدام به میزان یک میکرولیتر، DNA به میزان یک میکرولیتر و آب مقطر استریل به میزان لازم برای رسیدن به حجم نهایی انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR مرحله دوم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی مولار، ۰/۲

میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)، آغازگرهای DRBTF و DRBTR1 هرکدام به میزان یک میکرولیتر، رنگ evagreen ۱/۲۵ میکرولیتر، محصول PCR مرحله اول به میزان ۲/۵ میکرولیتر و آب مقطر استریل به میزان لازم برای رسیدن به حجم نهایی انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

برنامه PCR مرحله اول در دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO RAD انجام شد: مرحله اول واسرشت شدن اولیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. مرحله دوم شامل ۱۵ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. گام دوم اتصال آغازگرها ۶۵/۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. گام سوم طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه.

برنامه PCR مرحله دوم به صورت زیر در دستگاه Realtime شرکت Qiagen انجام شد: مرحله اول واسرشت شدن اولیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل ۳ گام: گام اول واسرشت شدن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. گام دوم اتصال آغازگرها ۵۹/۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. گام سوم طویل شدن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. مرحله سوم طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

در نهایت به منظور رویت نتایج حاصل از واکنش PCR و ارزیابی کیفیت و طول قطعه تکثیر شده، ۱۰ میکرولیتر از محصول دور دوم به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگزاری ۶X به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. پس از آن ژل با اتیدیوم بروماید (۱ میکرولیتر در میلی لیتر) رنگ آمیزی و قطعات ۱۳۸ جفت بازی به صورت باندهای فلورسنت در دستگاه UV ترانس ایلومیناتور مشاهده شد.

بر اساس روش به کار رفته در مطالعه Vahedi و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۲۰)، از محصول PCR مرحله دوم جهت تحلیل HRM و رسم Melt Curve استفاده شد. تحلیل HRM و Melt Curve در دستگاه Real-time Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. محدوده دمایی داده شده جهت تحلیل HRM ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تحلیل Melt Curve هم در محدوده دمایی ۷۸ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پیک‌های دمایی مربوط به آنالیز Melt curve جهت آنالیز در یک فایل اکسل جمع‌آوری گردید. براساس حضور یک پیک یا دو پیک، هوموزیگوتی یا هتروزیگوتی نمونه‌ها تشخیص داده شده و پس از آن توسط نمودار به دست آمده از آنالیز HRM تایید گردید. در نهایت نمودارهای مشابه به دست آمده در آنالیز HRM با درصد اطمینان ۹۰ درصد در یک گروه ژنوتیپی قرار گرفتند.

آنالیز آماری: فراوانی آللی، ژنوتیپی و هتروزیگوتی و هوموزیگوتی ژن DLA-DRB1 با استفاده از نرم افزار Popgene محاسبه شد (۲۴). ارتباط آلل‌های DLA-DRB1 با خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک و همچنین ارتباط هوموزیگوتی و هتروزیگوتی با خطر ابتلا به این بیماری از طریق محاسبه odd ratio (OR) نشان داده شد. توزیع فراوانی هر آلل در هر گروه شاهد و مورد با استفاده از آزمون مربع کای مقایسه گردید تا مشارکت هر آلل در میزان کلی مربع کای آزموده شود. برای آلل‌ها با فراوانی کم یا صفر، مخرج صفر خواهد بود و در این موارد OR تعریف نخواهد شد و فرمول وولف (Haldane`s modified Woolf formula) جهت محاسبه OR استفاده گردید. آزمون فیشر جهت بررسی معنی‌داری OR انجام شد. Odd ratio بزرگتر از یک به این معناست که سگ‌هایی که دارای آن آلل هستند خطر ابتلای به درماتیت آتوپیک در آن‌ها کمتر می‌باشند و مقاوم به بیماری می‌باشند. OR کمتر از یک به این معناست که در سگ‌های حامل آن آلل‌ها خطر ابتلای به درماتیت آتوپیک بیشتر می‌باشد و به این بیماری حساس می‌باشند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ (SPSS Institute, Chicago, IL, USA) انجام شد و $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری و $۰/۰۵ < P < ۰/۱$ به عنوان سطح معنی‌دار ضعیف در نظر گرفته شد.

نتایج

افزوده‌سازی ژن DLA-DRB1 جهت تحلیل HRM و Melt curve انجام شد و بر اساس نتایج تحلیل HRM و Melt curve نمونه‌ها به ۹ ژنوتیپ (A تا I) تقسیم‌بندی شدند. بیشترین فراوانی در نمونه‌های شاهد مربوط به تیپ I (۲۵ درصد) و در نمونه‌های بیمار مربوط به تیپ D (۳۵ درصد) بود. تیپ A فقط در نمونه‌های شاهد دیده شد و در نمونه‌های بیمار حضور نداشت (جدول ۳). همچنین فراوانی نمونه‌های هتروزیگوت و هوموزیگوت در نمونه‌های شاهد به ترتیب ۷۵ و ۲۵ درصد و در نمونه‌های بیمار به ترتیب ۹۵ و ۵ درصد بود.

جدول ۱. اطلاعات نمونه‌های جمع آوری شده جهت بررسی پلی مورفیسم آلل‌های DRB1.

نژاد	تعداد نمونه‌های آتوپیک	میانگین سنی نمونه‌های آتوپیک	تعداد شاهد	میانگین سنی گروه شاهد
Terrier	۹	۲ سال	۵	۱ سال و ۴ ماه
Schitzo	۱	۲ سال و ۶ ماه	۲	۲ سال
German Shepherd	۲	۱ سال و ۶ ماه	۳	۴ سال و ۵ ماه
Chihuahua	-	-	۱	۳ سال
Pekignese	۳	۲ سال و ۲ ماه	۲	۱ سال و ۸ ماه
Pomeranian	-	-	۱	۴ سال و ۶ ماه
Retriever	۲	۲ سال	-	-
Bulldog	-	-	۱	۳ سال و ۱ ماه
Spitz	۲	۳ سال و ۶ ماه	۲	۲ سال و ۲ ماه
Dobermann	۱	۹ ماه	۲	۴ سال و ۶ ماه
Boxer	-	-	۱	۱ سال

جدول۲. توالی و نام پرایمرهای به کار گرفته شده جهت افزوده سازی اگزون دوم DRLA-DRB1 برای آنالیز HRM.

طول قطعه تکثیر شده	توالی پرایمر		نام پرایمر
۳۰۳ bp	GAT CCC CCC GTC CCC ACA G	DRBF	جفت پرایمر مرحله اول PCR
	CGC CCG CTG TCA	DRBR3	
۱۳۸ bp	CCC CCG TCC CCA CAG	DRBTF	جفت پرایمر مرحله دوم PCR
	CCC CCA CGT CGC TGT C	DRBTR1	

جدول ۳. تیپ‌های ژنوتیپی یافت شده در نمونه‌های گروه شاهد و مطالعه به تفکیک نژاد.

نژاد نمونه‌های بیمار	تیپ ژنوتیپی	نژاد نمونه‌های سالم	تیپ ژنوتیپی
شیتزو تریر	I	ژرمن شفرد	I
دوبرمن	I	تریر	B
پکینیز	H	تریر	C
پکینیز	C	اشپیتز	C
اشپیتز	H	دوبرمن پینچر	A
تریر	D	پکینیز	H
تریر	D	باکسر	H
ژرمن شفرد	E	ژرمن شفرد	D
تریر	D	تریر	F
گلدن رتریور	B	شیتزو تریر	C
گلدن تریر	D	ژرمن شفرد	C
ژرمن شفرد	I	پکینیز	I
تریر	G	شی هوا هوا	I
پکینیز	I	تریر	G
تریر	D	پامرانین	I
تریر	I	شیتزو تریر	E
تریر	D	دوبرمن پینچر	I
اشپیتز	F	اشپیتز	H
تریر	F	بولداگ	D
گلدن رتریور	D	تریر	H

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپ‌های MHC، هتروزیگوتی و هوموزیگوتی و ارتباط آن‌ها با بیماری درماتیت آتوپیک در جمعیت مورد مطالعه.

ژنوتیپ	کل		گروه بیمار		گروه شاهد			
	تعداد	فراوانی (درصد)	تعداد	فراوانی (درصد)	تعداد	فراوانی (درصد)	Odds Ratio	*P*-value
A	۲	۵	۰	۰	۲	۱۰	۱/۱۱۱	۰/۰۲۴
B	۲	۵	۱	۵	۱	۵	۱	۰/۷۵۶
C	۵	۱۲/۵	۱	۵	۴	۲۰	۴/۷۵۰	۰/۱۰۰
D	۹	۲۲/۵	۷	۳۵	۲	۱۰	۰/۲۰۶	۰/۰۶۴
E	۲	۵	۱	۵	۱	۵	۱	۰/۷۵۶
F	۴	۱۰	۲	۱۰	۲	۱۰	۱	۰/۶۹۸
G	۲	۵	۱	۵	۱	۵	۱	۰/۷۵۶
H	۴	۱۰	۲	۱۰	۲	۱۰	۱	۰/۶۹۸
I	۱۰	۲۵	۵	۲۵	۵	۲۵	۱	۰/۶۴۲
هتروزیگوت	۳۴	۸۵	۱۹	۹۵	۱۵	۷۵	۰/۱۵۸	۰/۰۹۰
هوموزیگوت	۶	۱۵	۱	۵	۵	۲۵	۶/۳۳۳	۰/۰۹۰
جنس ماده	۱۸	۴۵	۸	۴۰	۱۰	۵۰	-	-
جنس نر	۲۲	۵۵	۱۲	۶۰	۱۰	۵۰	۰/۶۶۷	۰/۳۷۶

بر اساس آنالیز آماری انجام شده، حضور آلل تیپ D در ژن DLA-DRB1 می‌تواند حساسیت حیوان در برابر ابتلا به درماتیت آتوپیک را افزایش دهد (P = ۰/۰۶۴ و Odd ratio = ۰/۲۰۶). لازم به ذکر است این آلل در بیش از ۵۰ درصد سگ‌های بیمار نژاد ترریر حضور داشت. ۷۱/۴۲ درصد نمونه‌های بیمار که حامل آلل D بودند نژاد ترریر هستند، در حالیکه هیچکدام از موارد نژاد ترریر در گروه شاهد این آلل را نداشتند. بررسی آماری انجام شده نشان داد که هتروزیگوتی ژن DLA-DRB1 سبب افزایش خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک می‌شود (P=۰/۰۹۰ و Odd ratio = ۰/۱۵۸) و سگ‌هایی که ژن DLA-DRB1 آن‌ها هوموزیگوت باشد کمتر در معرض خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک قرار دارند (P = ۰/۰۹۰ و Odd ratio = ۶/۳۳۳). در مورد جنس حیوان و ارتباط آن با بیماری درماتیت آتوپیک نتیجه معنی‌داری وجود نداشت (P > ۰/۱). جدول ۴ تمامی داده‌های مربوط به فراوانی تیپ‌های ژنوتیپی مختلف، هوموزیگوتی و هتروزیگوتی، جنس و همچنین نتایج حاصل از آنالیز آماری را نشان می‌دهد.

بحث

از بین عوامل ژنتیکی مرتبط با بیماری درماتیت آتوپیک می‌توان به ژن‌های مولکول‌های عمده مجتمع بافتی (MHC) اشاره کرد (۱۲). ارتباط آلل‌های مختلف ژن‌های مولکول‌های MHC با درماتیت آتوپیک در انسان به اثبات رسیده است (۱۱،۱۳). این مولکول‌ها نقش مهمی در مبارزه با آنتی‌ژن‌ها و به طور کلی عوامل بیگانه دارد. این مولکول‌ها سبب تنظیم پاسخ ایمنی در برابر پادگن‌های برون زاد و تمایز پادگن‌های خودی از غیر خودی می‌شوند (۱۹). ارتباط آلل‌های DRB1 نیز در سگ با بسیاری از بیماری‌های با واسطه ایمنی از جمله لوپوس اریتماتوز سیستمیک، آتروفی آسینی پانکراس، بیماری آدیسون، مننگوانسفالیت نکروزان و فرونکلوز مقعد به اثبات رسیده است (۲). اما تا کنون مطالعه‌ای در ارتباط با درماتیت آتوپیک سگ و ارتباط آن با آلل‌های ژن DRB1 صورت نگرفته است.

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین فراوانی در گروه شاهد مربوط به آلل تیپ I و درگروه بیمار مربوط به تیپ D بود که نشان می‌دهد چند آلل خاص واجد بیشترین فراوانی در جمعیت سگ‌های سالم و مبتلا به درماتیت آتوپیک هستند و چهره غالب آللی جمعیت را شکل می‌دهند. هر چند جهت بررسی دقیق‌تر چهره آللی جمعیت سگ‌های سالم و مبتلا به درماتیت آتوپیک به مطالعات بیشتر با حجم نمونه بالاتری نیاز است. فراوانی نمونه‌های هتروزیگوت در گروه بیمار بیشتر از گروه شاهد (۲۰ درصد) بود و ۹۵ درصد بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک در این مطالعه دارای ژن DLA-DRB1 هتروزیگوت بودند. همچنین آنالیز آماری مطالعه حاضر نشان داد که سگ‌هایی که دارای ژن DLA-DRB1 هتروزیگوت می‌باشند به طور معنی‌داری حساسیت بیشتری به بیماری درماتیت آتوپیک دارند. گرچه جمعیت مورد بررسی در مطالعه حاضر (۲۰ قلاده) کم بوده است اما فراوانی بسیار بالای هتروزیگوتی در سگ‌های بیمار و نتایج به

دست آمده از آنالیز آماری دال بر نقش مهم هتروزیگوتی ژن DLA-DRB1 در افزایش حساسیت به درماتیت آتوپیک در سگ دارد. در مطالعه Vahedi و همکاران در سال ۲۰۱۹ که بر روی تومور پستانی سگ انجام شد نتایجی متفاوت از مطالعه حاضر به دست آمد و نشان داده شد هتروزیگوتی ژن HLA-DRB1 سبب کاهش خطر رخداد تومور پستانی در سگ می‌شود (۲۱). برخی مطالعات در انسان نیز نشان داده‌اند که هتروزیگوتی ژن HLA-DRB1 سبب افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های خودایمن همچون بیماری آرتریت روماتوئید، دیابت نوع ۱ و هپاتیت خود ایمن تیپ ۱ می‌شود (۴،۱۰). مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که ارتباط هتروزیگوتی ژن DLA-DRB1 و افزایش خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک را در سگ‌سانان نشان داده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۹ تیپ آللی شناسایی شده در HRM، حضور آلل تیپ D می‌تواند سبب افزایش حساسیت ابتلا به درماتیت آتوپیک شود. مطالعه‌ای که بر روی تومور پستانی سگ‌ها صورت گرفته است نیز نشان می‌دهد که حضور یک سری از آلل‌های DRB1 می‌توانند خطر ابتلا به تومور پستانی در سگ را افزایش دهند (۲۱). مطالعاتی که بر روی انسان انجام شده است نیز ارتباطات آلل‌های DRB1 و درماتیت آتوپیک را نشان می دهند. در مطالعه Margolis و همکاران در سال ۲۰۱۵ نقش موقعیت ۷۸ پاکت ۴ DRB1 (HLA-DRB1*0701; *0901)، موقعیت ۲۶ پاکت ۴ DRB1 (HLA-DRB1*0301; *0901) و موقعیت ۹ پاکت ۹ DRB1 (HLA-DRB1*0701; *0102; *1501; *1602; *1502; *1503; *0103; *1601) در افزایش ریسک ایتلا به درماتیت آتوپیک مشخص گردید (۱۱). همچنین در مطالعه Park و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که حضور آلل HLA-DRB1*1101 احتمال ابتلا به درماتیت آتوپیک را افزایش می‌دهد (۱۳). در مطالعه Friedenberg و همکاران در سال ۲۰۱۶ ارتباط ۱۵ ژن با چهار بیماری با واسطه ایمنی از جمله درماتیت آتوپیک در سگ مورد بررسی قرار گرفت. یکی از ژن‌های مورد مطالعه ژن DLA-79 بود که در MHC کلاس Ib قرار دارد. در این مطالعه نشان داده شد که فراوانی آلل DLA-79*001:02 در سگ‌های دارای درماتیت آتوپیک بالاست و حضور این آلل سبب افزایش خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک می‌شود (۵). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه بررسی ارتباط آلل‌های ژن کلاس MHC II با درماتیت آتوپیک در سگ صورت نگرفته است و مطالعه حاضر اولین مطالعه جهت بررسی ارتباط آلل‌های ژن DLA-DRB1 و خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک در سگ است. البته می‌توان به مواردی اشاره نمود که به ارتباط آلل‌های ژن DLA-DRB1 با انواع بیماری‌های خود ایمن، آلرژیک و عفونی در سگ توجه داشته‌اند. مطالعات بر روی تومور پستانی، کراتیت سطحی مزمن، هیپوآدرنوکورتیسیزم و مننگو انسفالیت نژاد گری هوند نشان داده است که حضور برخی آلل‌های ژن DRB1 خطر ابتلا به این بیماری‌ها را افزایش می‌دهند (۲،۶،۱۷،۲۱).

در مطالعه حاضر آلل تیپ D که در آنالیز آماری با افزایش خطر ابتلا به درماتیت آتوپیک مرتبط بوده است، در بیش از ۵۰ درصد جمعیت نژاد تریر این مطالعه حضور داشته است و نمونه‌های تریر در گروه شاهد فاقد این آلل بودند. همچنین بالای ۷۰ درصد آلل‌های D در جمعیت بیمار در سگ‌های نژاد تریر حضور داشتند. شاید بتوان این نتیجه را گرفت که سگ‌های نژاد تریر بیش از سایر نژادها به بیماری درماتیت آتوپیک حساس‌تر هستند و یکی از دلایل این حساسیت حضور همین آلل باشد. هر چند در مطالعه حاضر بیشترین جمعیت نژادی مربوط به نژاد تریر بوده و بررسی‌های بیشتر بر روی این نژاد و سایر نژادها با جمعیت آماری بالاتر توصیه می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر که در دانشگاه فردوسی مشهد در جهت بررسی میزان شیوع درماتیت آتوپیک در سگ‌ها صورت گرفت نشان داده شد که بیشترین موارد بیماری در سگ‌های نژاد تریر رخ می‌دهد که با نتیجه مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۹). در مطالعه Jaeger و همکاران در سال ۲۰۱۰ که در استرالیا، آلمان و آمریکا انجام شد نژادهای گلدن رتریور و ژرمن‌شفرد بیشترین درگیری را نشان می‌دادند. در مطالعه‌ای دیگر در کشور مجارستان نژادهای ویسلا، پامی، فرنچ بولداگ، دوبرمن‌پینچر و بابتیل بیشترین آمار ابتلا را در بین سگ‌های مبتلا به درماتیت آتوپیک داشته‌اند (۷).

بخش DRB1 از MHC کلاس II تنوع قابل ملاحظه‌ای دارد تا عرضه پادگن‌های مختلف امکان‌پذیر گردد. هرچه تنوع مولکول‌های MHC بیشتر باشد، افراد می‌توانند با طیف گسترده‌تری از عوامل بیماریزا مقابله نمایند. به منظور تعیین تنوع جایگاه ژنی مذکور، از روش‌های مختلفی جهت ارزیابی این چندشکلی استفاده شده است. یکی از این روش‌ها HRM می‌باشد که نتایج قابل قبول‌تر و مطمئن‌تری ارائه می‌نماید. روش‌های رایج اغلب PCR-RFLP یا PCR- SSCP می‌باشند

و چون بر اساس مقایسه چشمی کاربر انجام می‌شود، احتمال خطای انسانی در آن‌ها بالاست و به تجربه و دقت نظر بالا نیاز دارد (۲۰). انجام مطالعات مشابه بر روی بیماری‌های دیگر در سگ و سایر حیوانات خانگی، تحقیق بر روی سایر نژادها با توجه به تنوع نژادی بالا در سگ و همچنین مطالعه بر روی سایر ژن‌های MHC کلاس II و ژن‌های MHC کلاس I از پیشنهاداتی است که می‌توان در مطالعات آتی از آن‌ها استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه پرسنل محترم بیمارستان تخصصی دام‌های کوچک و بخش ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در به ثمر رسیدن این طرح تحقیقاتی تلاش نموده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Aguirre-Hernández, J., Polton, G., Kennedy, L.J., Sargan, D.R. (2010). Association between anal sac gland carcinoma and dog leukocyte antigen-DQB1 in the English Cocker Spaniel. Tissue Antigens, 76(6), 476-481. https://doi.org/ 10.1111/j.1399-0039.2010.01554.x
2. Barrientos, L.S., Zapata, G., Crespi, J.A., Posik, D.M., Díaz, S., It, V., Peral-García, P., Giovambattista, G. (2013). A study of the association between chronic superficial keratitis and polymorphisms in the upstream regulatory regions of DLA-DRB1, DLA-DQB1 and DLA-DQA1. Vet Immunol Immunopathol, 156(3-4), 205-210. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.10.009
3. Bieber, T. (2008). Mechanisms of disease: atopic dermatitis. N Engl J Med, 358(14), 1483-1494.
4. Czaja, A.J., Carpenter, H.A., Moore, S.B. (2008). HLA DRB1*13 as a risk factor for type 1 autoimmune hepatitis in North American patients. Dig Dis Sci,53(2), 522-528. https://doi.org/10.1007/s10620-007-9859-4
5. Friedenberg, S.G., Buhrman, G., Chdid, L., Olby, N.J., Olivry, T., Guillaumin, J., O'Toole, T., Goggs, R., Kennedy, L.J., Rose, R.B., Meurs, K.M. (2016). Evaluation of a DLA-79 allele associated with multiple immune-mediated diseases in dogs. Immunogenetics, 68(3), 205-217. https://doi.org/10.1007/s00251-015-0894-6
6. Hughes, A.M., Jokinen, P., Bannasch, D.L., Lohi, H., Pberbauer, A.M. (2010). Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocortism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers. Tissue Antigen, 75(6), 684-690. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01440.x
7. Jaeger, K., Linek, M., Power, H.T., Bettenay, S.V., Zabel, S., Rosychuk, R.A., Mueller, R.S. (2010). Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. Vet Dermatol, 21(1), 118-122. https://doi.org/10.1111/j. 1365-3164.2009.00845.x
8. Kelley, L., Flynn-Lurie, A., House, R.A., Simpson, A.C., Marsella, R. (2010). Safety and tolerability of 0.1% tacrolimus suspension applied to the external ear canals of high IgE beagle dogs without otitis. Vet Dermatol, 21, 554–565. https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00786.x
9. Khoshnegah, J., Pakzad, Shahabi, M. (2009). Canine atopic/allergic dermatitis in Mashhad (North-East of Iran): clinical observations. IJVR, 10(29), 352-359.
10. Lee, H.S., Lee, K.W., Song, G.G., Kim, H.A., Kim, S.Y., Bae, S.C. (2004). Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. Arthritis Rheum, 50(11), 3468-3475. https://doi.org/10.1002/art.20608
11. Margolis, D.J., Mitra, N., Kim, B., Gupta, J., Hoffstad, O.J., Papadopoulos, M., Wubbenhorst, B., Nathanson, K.L., Duke, J.L., Monos, D.S., Kamoun, M. (2015). Association of HLA-DRB1 genetic variants with the persistence of atopic dermatitis. Hum Immunol, 76(8), 571-577. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.08.003
12. Massey, J., Rothwell, S., Rusbridge, C., Tauro, A., Addicott, D., Chinoy, H., Cooper, R.J., Ollier, W.E.R., Kennedy, L.J. (2013). Association of an MHC class II haplotype with increased risk of polymyositis in hungarian vizsla dogs. PLoS ONE, 8(2), e56490. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056490
13. Park, H., Ahn, K., Park, M.H., Lee, S.I. (2012). The HLA-DRB1 polymorphism is associated with atopic dermatitis, but not egg allergy in Korean children. Allergy Asthma Immunol Res, 4(3), 143-149. https://doi.org/10.4168/aair.2012.4.3.143
14. Prélaud, P., Guagère, E., Alhaidari, Z., Faivre, N., Hèripret, D., Gayerie, A. (1998). Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. Rev Med Vet, 149, 1057–1064.
15. Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W.E. (2003). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. Immunogenetics, 55(1), 23-28.
16. Rabbani, M., Mahzoonieh, M. (2004). Veterinary Immunology (eds.). (1st ed.) University of Tehran Publications. Tehran, Iran. p. 202-225.
17. Shiel, R.E., Kennedy, L.J., Nolan, C.M., Mooney, C.T., Callanan, J.J. (2014). Major histocompatibility complex class II alleles and haplotypes associated with non-suppurative meningoencephalitis in greyhounds. Tissue Antigen, 84(3), 271-276. https://doi.org/10.1111/tan. 12365
18. Tarpataki, N., Pápa, K., Reiczigel, J., Vajdovich, P., Vörösi, K. (2006). Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. Acta Vet Hung, 54(3), 353-366. https://doi.org/10.1556/AVet.54.2006.3.6
19. Tizard, I. R. (2009). Veterinary Immunology, (eds.). (10th ed.) Saunders. Philadelphia, USA. p. 70-81.
20. Vahedi, S.M., Jamshidi, Sh., Mohajer, L.L., Brujeni, Gh.N. (2018). Allelic discrimination of canine MHC (DLA-DRB1)

by high resolution melt analysis. J Vet Res, 73(1), 93-100. https://doi.org/10.22059/jvr.2018. 137896.2392
21. Vahedi, S.M., Nikbakht, G., Jamshidi, S., Lankarani, L., Alimi, N., Esmailnejad, A. (2019). Association between DLA-DRB1.2 allelic diversity and development of mammary gland tumors in dogs. Acta Vet Scand, 61, 55. https://doi.org/10.1186/s13028-019-0491-z
22. Wagner, J.L. (2003). Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. J Hered, 94(1), 23–26.
23. Wilbe, M., Jokinen, P., Hermanrud, C., Kennedy, L.J., Strandberg, E., Hansson-Hamlin, H., Lohi, H., Andersson, G. (2009). MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex. Immunogenetics, 61(8), 557-64. https://doi.org/10. 1007/s00251-009-0387-6
24. Yeh, F.C., Boyle, T.J.B. (1997). Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. Belg J Bot, 129, 157-163.

Journal of Veterinary Research

J Vet Res, Volume 75, Number 3, 2020

Original Article

Association of DLA-DRB1 Alleles and Canine Atopic Dermatitis

Shadi Bozorgpanah[1], Shahram Jamshidi[2], Seyed Milad Vahedi[2], Leila Lankarani Mohajer[1], Gholamreza Nikbakht Brujeni[3]

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2019.245889.2726

Received: *12 February 2020*, ***Accepted:*** *13 March 2020*

Abstract

BACKGROUND: Major histocompatibility complex (MHC) is a group of genes which codes for binding of antigenic peptides and presenting them to T cells. MHC molecules polymorphism is associated with presenting different antigens, immune and autoimmune responses. One of the most important dog MHC genes is DRB1. The association between this gene and its alleles with Atopic Dermatitis has been reported.

OBJECTIVES: In this study, the association between canine Atopic Dermatitis and DLA-DRB1 alleles has been evaluated using HRM (High Resolution Melting) genotyping method.

METHODS: Blood samples were collected from 20 dogs with Atopic Dermatitis and 20 healthy dogs. Frequency of different DRB1 genotypes, as well as heterozygosity and homozygosity of alleles were analyzed using HRM. Their associations with Atopic Dermatitis were evaluated by statistical analysis.

RESULTS: Based on the HRM analysis, genotypes were grouped in 9 types (A-I). Statistical analysis showed that the presence of type D allele in the exon II of DLA-DRB1 gene increases the risk of Atopic Dermatitis (Odd ratio=0.206 and P=0.064). A significantly increased risk of Atopic Dermatitis in heterozygous samples was also observed (Odd=0.158 and P=0.090).

CONCLUSIONS: The results of this study showed that some alleles of DLA-DRB1 gene can play a role in the sensitivity or resistance to Atopic Dermatitis in dogs.

Keywords: Dermatitis, Atopic, MHC, Dog, Allele

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Nikbakht@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-61117000/021-66933222

How to cite this article:

Bozorgpanah, S., Jamshidi, S., Vahedi, S., Lankarani Mohajer, L., Nikbakht Brujeni, G. (2020). Association of DLA-DRB1 Alleles and Canine Atopic Dermatitis. J Vet Res, 75(3), 390-398. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.245889.2726

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Samples information collected for determination of DLA-DRB1 alleles polymorphism.
Table 2. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequences used for amplification the exon 2 of DLA-DRB1 for HRM analysis.
Table 3. Genotypes types of control and sample groups by breed.
Table 4. Frequency of different MHC genotypes and heterozygosity and homozygosity and their associations with atopic dermatitis.