

TÜRKİYE'DEKİ İNFLAMATUAR BARSAK HASTALARINDA HLA-DRB1 ALELLERİNİN DAĞILIMI

F.Aytül UYAR*, Neşe İMERYÜZ**, Güher SARUHAN-DİRESKENELİ*,
Hasan Ali ÇEKEN**, Osman ÖZDOĞAN**, Nurdan TÖZÜN**

ÖZET

Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) ile HLA sınıf II genleri arasında son yıllarda tanımlanan farklı ilişkiler hastalığa yatkınlıkta genetik çeşitlilik olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada, Türkiye popülasyonunda CH (n=15) ve ÜK (n=59) hastalarındaki HLA-DRB1 alelleri sağlıklı kontrollerle (n=244) karşılaştırılarak incelendi. Polimeraz zincir reaksiyonu ve diziyce özgü oligonükleotid hibridizasyonla genotiplleme metodu uygulandı. Kontrol grubuna kıyasla ÜK li hastalarda DRB1*1502 aleli ile pozitif (10/59 vs. 16/244, p = 0.02, OR: 2.9), DRB1*13 ile negatif (7/59 vs. 64/244, p = 0.03, OR: 0.38) ilişki olduğu gözlemlendi. Buna karşın Crohn hastalarında DRB1*08 sıklığı kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi. Sonuçlar, ÜK ve CH nin genetik olarak farklı hastalıklar olduğu hipotezini desteklemektedir. Türkiye popülasyonunda ÜK hastalığına yatkınlıkla direkt DRB1*1502 aleli veya bu aleli taşıyan haplotipin ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: HLA-DRB1, ülseratif kolit, Crohn hastalığı.

SUMMARY

*The distribution of HLA DRB1 alleles in inflammatory bowel disease patients in Turkey. Recently described distinct associations of HLA class II genes with ulcerative colitis and Crohn's disease suggest a genetic heterogeneity of disease susceptibility. In this study, HLA-DRB1 alleles were investigated in a population of UC (n=59) and CD (n=15) patients from Turkey compared to controls (n=244) with molecular genotyping by polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide hybridization. We observed a positive association with the HLA-DRB1*1502 allele (10/59 vs. 16/244, p = 0.02, OR: 2.9) and a negative association with the DRB1*13 allele (7/59 vs. 64/244, p = 0.03, OR: 0.38) in patients with UC, DRB1*08 allele increased significantly in patients with Crohn's disease compared to controls. These results support the hypothesis that UC and CD may be genetically distinct disorders. DRB1*1502 allele or haplotype bearing it, is associated with UC susceptibility in Turkish population.*

Key words: HLA-DRB1, ulcerative colitis, Crohn's disease.

GİRİŞ

Kronik inflamatuvar barsak hastalığı, Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığından (CH) oluşmakta olup etyolojisi bilinmemektedir. Etyopatogeneizde immün mekanizmaların rolü üzerinde durulmakta; genetik, özellikle immün genetik ve çevresel faktörlerin birlikte bu hastalıkların gelişimine katkıda buldukları kabul edilmektedir (9). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ÜK ve CH nin HLA sınıf II lokusu ile ilişkisi bu hastalıkların ge-

netik olarak farklı hastalıklar olduklarını düşündürmektedir (9,14).

Japonlarda ÜK hastalığı ile HLA-DR2 ilişkili bulunup, DRB1*1502 ile sınırlı olduğu gösterilmiştir (5,8,11,18). DR2 ilişkisini gösteren diğer bir çalışma Musevileri de kapsayan karma bir popülasyonunun bulunduğu Kaliforniya'dan bildirilmiştir (14). İspanyol ÜK li hastalarda ise DR2 ilişkisinin DRB1*1501 ile sınırlı olduğu gösterilmiştir (3). Bu bulgulara karşın diğer birçok popülasyon çalış-

Mecmuaya geldiği tarih: 11.02.2000

* İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, İstanbul

malarında (2,4,6) ÜK hastalığı ile DR2 veya herhangi bir HLA sınıf II aleli ile pozitif ilişki gösterilememiştir.

Crohn hastalığı ile ilişkinin gösterildiği çalışmalar daha az sayıda olup farklı etnik topluluklarda farklı DR ve/veya DQ alelleri ile anlamlı birkaç ilişki gösterilebilmiştir (6,7,14,17). Forcione ve ark., Boston'da, beyaz ırk özelliği taşıyan bir popülasyonda CH ile HLA-DRB3*0301 ve HLA-DRB1*1302 alellerinin pozitif ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (6).

Bu çalışmada Türkiye popülasyonunda ÜK ve CH' a yatkınlıkla ilişkili herhangi bir HLA-DRB1 alelinin olup olmadığını incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Deney grubu: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Gastroenteroloji Kliniğinde izlenen 59 ÜK ve 15 CH'nin kan örnekleri toplandı. Kontrol grubu 244 sağlıklı kişi arasından seçildi. Tanı, endoskopik, histolojik ve klinik kriterlere göre kondu.

HLA-DRB1 tiplemesi: Genomik DNA periferik kan lökositlerinden elde edildi. Her bir DNA örneğinin DRB1 genlerinin polimorfik 2. eksonları XII. Uluslararası HLA "Workshop" protokolüne göre bu bölgeye özgü iki sentetik primer (DRBAMP-A ve DRBAMP-B) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR ürünleri "dot blot" tekniği ile naylon membrana (Hybond N+, Amersham) yüklenerek DRB1 lokusu dizilerine özgü biotinle işaretli 34 ayrı oligonükleotid (DÖO) proba hibridize edildi (1).

HLA-DR2 alt tiplemesi: DR2 aleli taşıyan 25 ÜK hastasında DR2 alt tiplemesi yapıldı. DR2 ye özgü 2DRBAMP-2 ve 2DRBAMP-B primerleri kullanılarak yukarıda izlenen protokole göre çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin DR2 alellerine özgü 7

farklı diziye özgü oligonükleotid proba hibridize edilerek alelik dağılımları ortaya çıkarıldı (1).

İstatistik değerlendirme: İstatistiksel anlamlılık χ^2 testi ve gerektiğinde Fisher'in "exact" testi kullanılarak hesaplandı. $P < 0.05$ anlamlı değer olarak kabul edildi. İlk kez gösterilen ilişkiler için, yapılan karşılaştırma sayısına göre düzeltme (p_c) uygulandı (12).

BULGULAR

ÜK, CH ve kontrol grubundaki DRB1 alellerinin dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm hasta ve kontrol grubunun fenotip frekansı karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte DR2 alelleri ÜK li hasta grubunda yüksek bulundu (27/59 vs. 77/244, $p = 0.056$, OR: 1.83). DR2 pozitif grubun alt tiplemesi, ÜK hasta grubundaki DRB1*1502 alel sıklığının kontrol grubundan yüksek olduğunu ortaya koydu (10/59 vs. 16/244, $p = 0.02$, OR: 2.9). ÜK hastalarında DRB1*1501 sıklığı DRB1*1502 sıklığına eşit olmasına rağmen, kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamadı. ÜK hastalarında DRB1*13 sıklığı kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu (7/59 vs. 64/244, $p = 0.03$, OR: 0.38).

Hastalık ağırlığı, uzanımı veya tedavi şekilleri (5-ASA, immünsüpresiv ilaç veya kolektomi) ile herhangi bir HLA-DRB1 aleli arasında korelasyon gösterilemedi.

CH da DRB1 alel dağılımı oldukça farklı bulundu. ÜK li hasta grubu ile ilişkili bulunan alellerin hiçbiri CH ile ilişkili bulunmadı. DRB1*08 CH da anlamlı olarak yüksek bulundu (5/15 vs. 18/244, $p = 0.006$, OR: 6.28). Fakat istatistiksel düzeltme ile anlamlılık kayboldu.

TARTIŞMA

Bu çalışmada ilk defa Türkiye popülasyonundaki ÜK ve CH ile HLA ilişkisini incele-

Tablo 1. İnflamatuvar barsak hastalığı ve kontrol grubundaki HLA-DRB1 dağılımı

| DRB1 | Kontrol (n=244) | | ÜK (n=59) | | CH (n=15) | | ÜK vs. kontrol | | CH vs. kontrol | |
|-------|--------------------|------|--------------|------|--------------|------|-------------------|------|-------------------|------|
| | n | % | n | % | n | % | p | OR** | p | OR |
| *01 | 28 | 11.5 | 9 | 15.3 | 2 | 13.3 | | | | |
| *1501 | 34 | 13.9 | 10 | 16.9 | 0 | 0 | | | | |
| *1502 | 16 | 6.6 | 10 | 16.9 | 1 | 6.7 | 0.02 | 2.9 | | |
| *1601 | 27 | 11.1 | 7 | 11.9 | 1 | 6.7 | | | | |
| *03 | 42 | 17.2 | 5 | 8.5 | 2 | 13.3 | | | | |
| *04 | 66 | 27.0 | 11 | 18.6 | 2 | 13.3 | | | | |
| *0701 | 40 | 16.4 | 8 | 13.6 | 2 | 13.3 | | | | |
| *08 | 18 | 7.4 | 5 | 8.5 | 5 | 33.3 | | | 0.006* | 6.28 |
| *0901 | 5 | 2.0 | 0 | 0 | 2 | 13.3 | | | | |
| *1001 | 10 | 4.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| *11 | 83 | 34.0 | 28 | 47.5 | 5 | 33.3 | | | | |
| *12 | 10 | 4.1 | 3 | 5.1 | 1 | 6.7 | | | | |
| *13 | 64 | 26.2 | 7 | 11.9 | 3 | 20.0 | 0.03 | 0.38 | | |
| *14 | 32 | 13.1 | 12 | 20.3 | 3 | 20.0 | | | | |

* $p_c = 0.08$ **OR: Odds ratio ÜK: Ülseratif kolit CH: Crohn Hastalığı

yerek DRB1 alel dağılımı etnik olarak uygun sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır. ÜK hastalığı ile DRB1*1502 arasında pozitif ve DRB1*13 arasında negatif ilişki bulunmuştur. Daha küçük bir grup olmakla birlikte CH ile DRB1*08 arasında anlamlı bir pozitif ilişki gösterilmiştir. Bu veriler bu hastalıkları oluşturan mekanizmaların farklı genetik temeli olabileceğini düşündürmektedir.

ÜK ile DRB1*1502 arasındaki pozitif ilişki Japonlarda elde edilen verilerle uyumlu bulunmaktadır (5,8,18). Buna karşın çoğunlukla beyaz ve Avrupa kökenli popülasyonlarda ÜK ile DRB1 arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir (2,4,6). Bu farklı sonuçlar farklı etnik topluluklardaki DR2 alttiplerinin frekansı ile ilişkili olabilir. DRB1*1502 beyaz ırktaki DR2 alellerinin %5 inden daha azını oluştururken Japonlarda %57 oranında görülmektedir (10). İlginç olarak sağlıklı popülasyondaki DR2 oranı %20 olmasına rağmen, ÜK ile DRB1*1502 yi ilişkili bulduk. De La Concha ve ark., beyaz ırkta DRB1*1502 etkisinin frekansının düşük olması nedeniyle baskılandığını ileri sürmek-

tedir (3). Aynı zamanda DRB1*1502 nin hastalık seyrini belirleyici de olduğunu bildiren iki çalışma olmasına rağmen, biz bu çalışmada böyle bir ilişki bulamadık (5,8). Daha önceki çalışmamızda ÜK hastalığının sublinik bir belirleyicisi olan pANCA (*perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody*) durumuna göre değerlendirdiğimizde de DRB1*1502 aleli ile herhangi bir ilişki gösterememiştik (15).

ÜK hastalığı ile DRB1*13'ün negatif ilişki göstermesi, DRw6 ile bildirilen negatif ilişkide olduğu gibi hastalığın gelişmesine karşı koruyucu bir etkisi olduğuna işaret edebilir (14).

CH ile DRB1*08 arasında düzeltme yapıldığında kaybolmakla birlikte anlamlı bir ilişki bulundu. Araştırılan hasta grubunun küçük olması nedeniyle değerlendirme yapmak ancak CH sayısının artırılması ile mümkün olacaktır. Forcione ve ark.'nın önerdiği CH ile DRB3*0301 ilişkisi bizim çalışma grubumuzda DRB3 geni değerlendirilmemesine rağmen pek olası görünmüyor (6). Çünkü DRB3*0301 in bağlantı dengesizliği gösterdiği DR13 ve dolayısıyla DRB1*1302 nin

frekansı incelenen grupta göreceli olarak çok düşük bulunmuştur (13,16).

Sonuç olarak, bu çalışma ÜK ve CH'nin genetik olarak farklı hastalıklar olduğu hipotezini desteklemektedir. Türkiye popülasyonunda ÜK hastalığına yatkınlıkla DRB1*1502 aleli veya bu aleli taşıyan haplotipin ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje no: 820/190496.

KAYNAKLAR

1. Bignon JD, Fernandez-Vina M: Technical Handbook: 12th International HLA Workshop Class II Reference, editör: Charron D, Fauchet R, Paris (1996).
2. Bioque G, Bouma G, Crusius JB, Koutroubakis I, Kostense PJ, Meuwissen SG, Pena AS: Evidence of genetic heterogeneity in IBD: The interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8:105 (1996).
3. De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Santa-Cruz S, Lopez-Nava G, Figueredo MA, Diaz-Rubio M, Garcia-Paredes J: Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 108:392 (1997).
4. Duerr RH, Neigt DA: Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology* 108:423 (1995).
5. Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, Ohmoto A, Okano H, Miyamoto M, Inaba H, Naruse T, Nose Y, Kasuga M: HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 40:814 (1995).
6. Forcione DG, Sands B, Isselbacher KJ, Rustgi A, Podolsky DK, Pillai S: An increased risk of Crohn's disease in individuals who inherit the HLA class II DRB3*0301 allele. *Proc Natl Acad Sci, USA* 93:5094 (1996).
7. Hesresbach D, Alizadeh M, Bretagne JF, Gautier A, Qullivic F, Lemarchand B, Gosselin M, Genetet B, Semana G: Investigation of the association of major histocompatibility complex genes, including HLA class I, class II and TAP genes, with clinical forms of Crohn's disease. *Eur J Immunogenet* 23:141 (1996).
8. Masuda H, Nakamura Y, Tanaka T, Hayakawa S: Distinct relationship between HLA-DR genes and intractability of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 89:1957 (1994).
9. Rotter JI. Immunogenetic susceptibilities in IBD. *Can J Gastroenterol* 4:261 (1990)
10. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 347:1212 (1996)
11. Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, Inoue M, Hibi T, Yagita A, Tsuji K, Inoko H: Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol* 36:112-8. (1993).
12. Svejgaard A, Jersild C, Nielsen LS, Bodmer WF: HLA antigens and disease: statistical and genetic consideration. *Tissue Antigens* 4:95 (1974).
13. Tiercy JM, Gorsky J, Betuel H, Freidel AC, Gebuhrer L, Jeannot M, Mach B: DNA typing of DRw6 subtypes: correlation with DRB1 and DRB3 allelic sequences by hybridization with oligonucleotide probes. *Hum Immunol* 24:1 (1989)
14. Toyoda H, Wang S-J, Yang H-Y, Redford A, Magalong D, Tyan D, McElree CK, Pressman SR, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI: Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104:741 (1993).
15. Uyar FA, İmeryüz N, Saruhan-Direskeneli G, Çeken H, Özdoğan Ö, Şahin Ş, Tözün N: The distribution of HLA-DRB alleles in ulcerative colitis in Turkey. *Eur J Immunogenet* 25:293 (1998).
16. Vaughan RW, Lanchbury JS, Marsh SG, Hall MA, Bodmer JG, Welsh KI: The application of oligonucleotide probes to HLA class II typing of the DRB sub-region. *Tissue Antigens* 36:149 (1990).
17. Wassmuth R, Eastman S, Kockum I, Holmberg E, Starck M, Lindhagen T, Kalden JR, Lermmark A, Sundkvist G, Lindgren S: HLA DR and DQ RFLP analysis in Crohn's disease. *Eur J Immunogenet* 20:429 (1993).
18. Yoshitake S, Kimura A, Okada M, Yao T, Sasazuki T: HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*; 53:350 (1999).