ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ
ORIGINAL ARTICLES

СИСТЕМЕН LUPUS ERYTHEMATOSUS И ЕСТРОГЕН-РЕЦЕПТОРЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ ПРИ БЪЛГАРКИ

Д. Танев[1], Р. Робева[2], С. Андонова[3], М. Николова[4], М. Стойчева[5], А. Томова[2], Ф. Куманов[2], А. Савов[3], Р. Рашков[1] и Зл. Коларов[1]

[1]Клиника по ревматология, МУ – София
[2]Клиничен център по ендокринология и геронтология, МУ – София
[3]Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин дом" – София
[4]Клиника по нефрология, МУ – София
[5]Катедра по социална медицина и социален мениджмънт, Секция „МИБС", МУ – София

Резюме. *Системният lupus erythematosus (СЛЕ) е автоимунно заболяване, което засяга основно женския пол. Естрогените модулират растежа, диференциацията и пролиферацията на лимфоидните клетки, синтеза на цитокини и антитела и процесите на апоптоза. Женските полови хормони оказват своите ефекти върху тъканите чрез естрогенните рецептори. Целта на нашето изследване е да се проучи ролята на полиморфните PvuII T/C и XbaI A/G участъци в гена за естрогенния рецептор алфа (ЕРα) за развитието и клиничната изява на системния лупус. Бяха изследвани 112 жени със СЛЕ и 50 контроли, като алелното разпределение на двата полиморфизъма беше сходно сред здравите и болните жени. Установи се връзка между полиморфизмите на ЕРα и някои клинични прояви на СЛЕ. Сред болните с генотип ppxx (TTAA) фоточувствителността беше по-рядка, отколкото при останалите, докато неврологичното ангажиране не беше характерно за болните с генотип PPXX (CCGG). В заключение може да се предположи, че полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G в гена за ЕРα не са свързани с развитието на системния лупус, но вероятно модулират клиничните прояви на болестта.*

Ключови думи: *системен lupus erythematosus, естрогенен рецептор, PvuII, XbaI полиморфизъм*

D. Tanev, R. Robeva, S. Andonova, M. Nikolova, M. Stoycheva, A. Tomova, Ph. Kumanov, A. Savov, R. Rashkov and Zl. Kolarov. *SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND ESTROGEN RECEPTOR POLYMORPHISM IN BULGARIAN WOMEN*

Summary. *Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease, which affects predominantly women. Estrogens modulate the growth, differentiation and proliferation of lymphoid cells, the synthesis of cytokines and antibodies, as well as the processes of apoptosis. Female sex hormones act on different tissues through the estrogen receptors. The aim of our study was to investigate the role of the polymorphic regions PvuII T/C and XbaI A/G in the estrogen receptor alpha gene (ERα) for the development and clinical characteristics of systemic lupus. 112 women with SLE and 50 controls were investigated. The allele frequency of the two polymorphisms was similar among patients and healthy women. Some relationships between ERα polymorphisms and some of the clinical features of SLE were established. In the patients with genotype ppxx (TTAA), photosensitivity was less frequent, than in the others, while neurological involvement was not present in patients with genotype PPXX (CCGG). In conclusion, we suggest that PvuII T/C and XbaI A/G polymorphisms of ERα gene are not crucial for the development of SLE, but they presumably modulate the clinical features of the disease.*

Key words: *systemic lupus erythematosus, estrogen receptor, PvuII, XbaI polymorphism*

Увод

Systemic lupus erythematosus (СЛЕ) е системно заболяване на съединителната тъкан, при което предимно антинуклеарни и фосфолипидни антитела реагират кръстосано с кожата и вътрешните органи, като обуславят разнообразна клинична картина [1]. Етиологията и патогенезата на болестта са неизвестни. Предполага се съществената роля на генетичната предиспозиция. От своя страна фенотипната изява зависи от различни външни фактори, сред които вероятна е ролята и на хормоналната среда, тъй като болестта е много по-честа при женския пол.

Високата заболяемост сред жените е по-изразена след пубертета – СЛЕ се среща три пъти по-често при девойки, отколкото при момчета, а съотношението между жени и мъже в репродуктивна възраст е 10 : 1 [10]. От изразения полов диморфизъм и засягането преди всичко на болни във фертилна възраст се предполага, че женските полови хормони са рисков фактор за развитието на болестта. Естрогените модулират растежа, диференциацията и пролиферацията на лимфоидните клетки, синтеза на цитокини и антитела и клетъчната преживяемост. При СЛЕ те могат да потискат Т-клетъчната апоптоза и съответно да стимулират развитието на автореактивни Т-клетки [3, 11, 15]. Ролята на женските полови хормони за развитието и протичането на СЛЕ при опитни животни е доказана от редица изследователски колективи, докато данните, установени при хора, са противоречиви. В различните проучвания са наблюдавани по-високи, по-ниски или сходни концентрации на серумните естрогени при пациентките със СЛЕ в сравнение със здравите контроли. Това показва необходимостта от допълнителни изследвания [2].

Естрогените оказват биологичните си ефекти върху тъканите чрез естрогенните рецептори алфа (ЕРα) и бета (ЕРβ), гените за които се намират в 6-а и 14-а хромозома. Ролята им за патогенезата и проявите на СЛЕ е слабо проучена. В мононуклеарни периферни кръвни клетки на болни с лупус се установяват повишена експресия на матрична РНК за ЕРα и понижена – за ЕРβ в сравнение със здрави хора [7]. Значението на полиморфните PvuII T/C и XbaI A/G участък в гена за ЕРα не е изследвано сред български болни с лупус. Поради това си поставихме целта да проучим ролята на генните полиморфизми за фенотипната изява и тежестта на СЛЕ сред болни жени от българската популация.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пациенти и контроли

В проучването са включени 162 жени – 112 с лупус и 50 здрави контроли. Диагнозата СЛЕ е поставена по модифицираните критерии на ACR от 1997 г. при наличие на поне 4 критерия [4]. При всички пациентки са регистрирани възрастта към момента на изследването, възрастта при поява на болестта, формите на болестта, проявени от началото на заболяването (кожна, ставна, хематологична, бъбречна, сърдечна, белодробна, неврологична – невролупус, имунологична, първичен антифосфолипиден синдром), позитивираните автоантитела (anti-Sm, anti-dsDNA, anti-RNP, anti-SSa – Ro, anti-SSb – La), ACL, anti-B2GP1, anti-Protrombin). Наличието на цереброваскулит е обективизирано с инструментални методи (ЯМР, ЕЕГ). Стандартизиран въпросник за оценка на протичането на болестта е попълнен от всички болни. Контролната група е набрана сред медицински персонал и студентки по медицина. Болните и контролите подписаха информирано съгласие за участие в проучването, одобрено от етичната комисия към МУ с протокол № 49/29.06.2010 г.

Генетичен анализ

Генетичният анализ е извършен с високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки посредством изсолване на белтъците, без използване на токсични реагенти. Съгласно международните изисквания венозната кръв е взета в пластмасова епруветка с обем 3-10 ml, съдържаща K_3 EDTA (етилен диамин тетраацетат) като антикогулант.

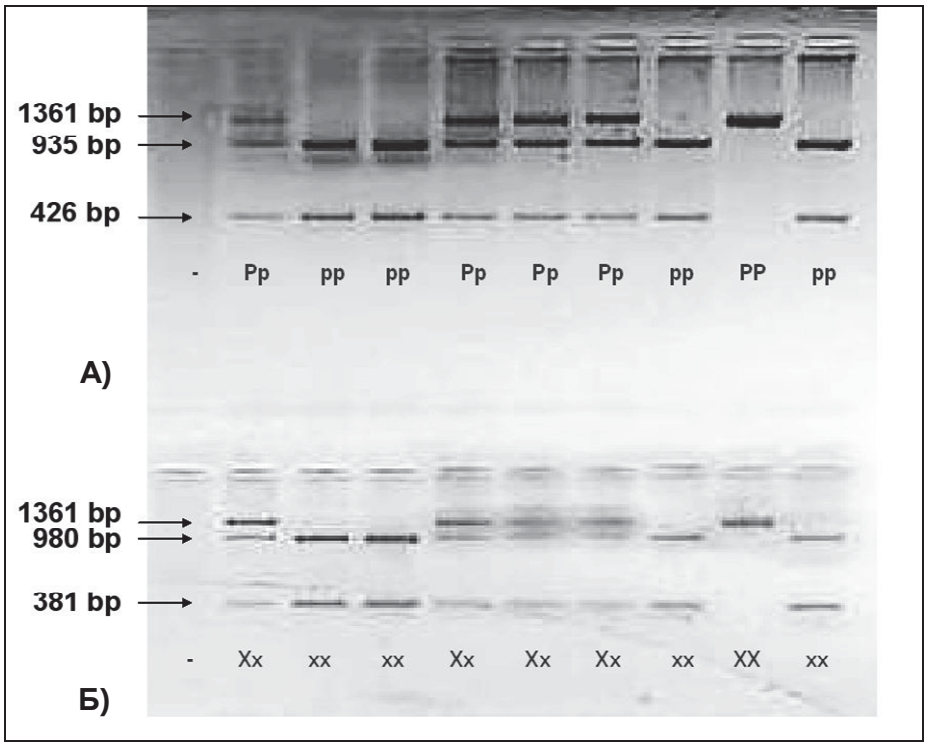
Пациентките и здравите контроли са генотипизирани за ERα полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G чрез RFLP анализ, по метода на Jakimiuk et al. [8]. Липсата на PvuII и XbaI рестрикционни участъци е обозначена като "P" и "X", а наличието им – съответно като "p" и "x". Рестрикцията е провеждана в течение на една нощ на t 37°C. Фрагментите са разделени чрез хоризонтална нисковолтова агарозна електрофореза – на 2.5% агарозен гел, с интеркалиращ агент етидиев бромид, което позволява визуализирането на молекулата и на UV светлина. На табл. 1 са представени основните характеристики на ERα и информация за полиморфизмите PvuII и XbaI, които са обект на изследване в проучването, за използваните праймерни последователности и очакваните рестрикционни профили. Електрофоретограмата е представена на фиг. 1.

Статистически анализ

За описание на данните са използвани дескриптивна статистика и честотен анализ. Разликите в честотите са определени по метода χ^2 и чрез точния критерий на Fisher. След тест на Kolmogorov–Smirnov за нормалност на разпределението разликите между двете групи са определяни чрез t-тест за независими извадки. При проверка на хипотези използваното критично ниво на значимост е 0.05. Статистическият анализ е извършен чрез SPSS v. 13 за Windows.

Таблица 1. Характеристика на ERα и полиморфизмите PvuII и XbaI

– **Естрогенен рецептор** α	– **Характеристики**
– Ген	– ESR1
– Локализация	– 6q25.1
– Протеин	– 595 аминокиселини
– Праймерна двойка за PvuII Праймерна двойка за XbaI	– (F) 5'–CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC–3' (R) 5'–TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA–3'
– Дължина на PCR продукта	– 1361 bp
– Детекция на полиморфизмите	– Чрез рестрикционен (RFLP) анализ – върху 2.5% агарозен гел
– PvuII полиморфизъм	– c.453-397 C >T
– XbaI полиморфизъм	– c.453-351 G > A
– RFLP анализ	– С рестриктазата PvuII: C > T замяната води до създаване на рестрикционно място. Липсата на PvuII рестрикционен участък се обозначава като "P", а наличието на рестрикционно място – като "p". С рестриктазата XbaI: G > A замяната води до създаване на рестрикционно място. Липсата на XbaI рестрикционен участък се обозначава като "X", а наличието на рестрикционно място – като "x".
– Дължина на получените след рестрикцията фрагменти	– Генотип PP (CC) : 1361 bp Генотип Pp (CT) : 1361bp + 935bp + 426bp Генотип pp (TT) : 935bp + 426bp
– Дължина на получените след рестрикцията фрагменти	– Генотип XX (GG) : 1361 bp Генотип Xx (GA) : 1361bp + 980bp + 381bp Генотип xx (AA) : 980bp + 381bp



Фиг. 1. Електрофоретограма на 2.5% агарозен гел за определяне на полиморфизмите PvuII T/C (А) и XbaI A/G (Б) в гена за естрогенния рецептор α.
Пробите са визуализирани върху 2.5% агарозен гел. На стартовете са отчетени хомозиготи по полиморфизма, създаващ рестрикционно място (съответно pp и xx), хетерозиготи за полиморфизма (съответно Pp и Xx) и хомозигот по липсата на рестрикционно място (съответно PP и XX).

Резултати

Средната възраст на болните жени със СЛЕ е 40.31 ± 10.61 (20-58) г., а средната възраст на изява на болестта – 31.21 ± 11.06 г. Алелните честоти на XbaI и PvuII полиморфизмите са отразени в табл. 2. Разпределението на алелните честоти на двата полиморфизъма спрямо всеки от ACR критериите е показано на табл. 3.

Най-често срещаните комбинирани генотипи сред изследваната популация са PPXX (8.6%), PpXx (43.8%) и ppxx (36.4%). При техния анализ се установи, че болните с генотип PPXX страдат значимо по-рядко от неврологични усложнения в сравнение с останалите (0% срещу 35.9%, p = 0.028). При пациентите с генотип PPXX и PpXx значително по-често се среща фоточувствителност в сравнение с болните с алел ppxx (82% срещу 58.5%, p = 0.013). Честотата на останалите ACR критерии е сходна сред пациентите с трите най-често срещани генотипа. Останалите комбинирани генотипи не са интерпретирани поради много малката им честота в изследваната група.

Таблица 2. Разпределение на алелните честоти на полиморфизмите XbaI и PvuII в гена за ЕРα при болните и здравите жени

Полиморфизми	Генотип	Здрави жени	Болни със СЛЕ
XbaI	XX	8%	8%
XbaI	Xx	42%	49.1%
XbaI	xx	50%	42.9%
PvuII	PP	12%	9.8%
PvuII	Pp	52%	52.7%
PvuII	pp	36%	37.5%

Не се установиха значими различия между възрастта на изява или давността на заболяването, от една страна, и полиморфизмите на ЕРα – от друга страна (p > 0.05).

Таблица 3. Алелни честоти на XbaI полиморфизма спрямо критериите на ACR

–	– XbaI			– PvuII		
– **ACR критерии**	– **XX**	– **Xx**	– **xx**	– **PP**	– **Pp**	– **pp**
– Пеперудообразен обрив	– 33.3%	– 40%	– 33.3%	– 27.3%	– 39.0%	– 35.7%
– Дискоиден обрив	– 11.1%	– 9.1%	– 14.6%	– 9.1%	– 8.5%	– 16.7%
– Фоточувствителност	– 88.9%	– 80.0%	– 60.4%	– 81.8%	– 79.7%	– 59.5%
– Афтоза	– 33.3%	– 16.4%	– 20.8%	– 27.3%	– 15.3%	– 23.85
– Артрит/артралгии	– 100%	– 98.2%	– 100%	– 100.0%	– 98.3%	– 100.0%
– Серозит	– 22.2%	– 16.4%	– 16.7%	– 18.2%	– 20.3%	– 11.9%
– Бъбречно засягане	– 22.2%	– 25.5%	– 22.9%	– 18.2%	– 25.4%	– 23.8%
– Неврологично засягане	– 0%	– 33.3%	– 36.4%	– 9.1%	– 32.2%	– 38.1%
– Хематологично засягане	– 55.6%	– 58.2%	– 72.9%	– 54.5%	– 61.0%	– 71.4%
– Имунологично засягане	– 66.7%	– 80.0%	– 75.0%	– 63.6%	– 79.7%	– 76.2%
– Положителни ANA	– 88.9%	– 69.1%	– 68.8%	– 90.9%	– 67.8%	– 69.0%

Обсъждане

СЛЕ е автоимунно заболяване, което се характеризира със свръхсинтез на автоантитела и разнообразна клинична изява. Етиологията му е неизвестна, но се предполага, че както при повечето автоимунни заболявания фактори на околната среда предизвикват отключване на патологичния процес при хора с генетично предразположение. Фактът, че между 80 и 90% от болните са жени, предполага, че половите хормони имат съществено значение за патогенезата на СЛЕ, но до момента няма ясна концепция за тяхната роля [5]. По отношение на патогенезата и клиничните прояви на СЛЕ е уместно да се обсъжда не само ролята на естрогените, но и на техните рецептори и съответно на рецепторния полиморфизъм. Резултатите от нашето проучване показват сходно алелно разпределение на ERα полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G при болните с лупус и здравите жени. Аналогично, други европейски и азиатски проучвания също не намират разлика в алелните честоти при пациенти със СЛЕ и здрави контроли [9, 14]. Обратно – американски автори

съобщават за повишен риск от лупус при наличието на генотип PP или XX [16]. Наблюдаваните разлики вероятно се дължат на етнически различия. Уместно е да се отбележи относително малкият брой изследвани болни в американското проучване – 46 жени със СЛЕ.

Една от целите на нашето изследване е да се определи дали полиморфизмът на ЕРα влияе върху клиничните изяви на СЛЕ. Резултатите показват, че пациентите с генотип ppxx страдат значително по-рядко от фоточувствителност в сравнение с останалите. Същевременно нито една от болните с генотип PPXX не показа симптоми на неврологично ангажиране, докато честотата на невролупуса сред пациентките с генотип PpXx и ppxx е 35.9%. Тъй като XbaI G (X) и PvuII C (P) алел се срещат в свързани комбинации много по-често, отколкото може да се очаква теоретично (т.нар. linkage disequilibrium), изследването на комбинираните генотипи е по-важно, отколкото изолираното разглеждане на двата полиморфни участъка. Този факт не е изненадващ, като се има предвид че двата полиморфизъма са разделени само от 50 двойки бази в първи интрон на гена за ЕРα [8]. Нашите резултати подкрепят изводите от единственото до момента европейско проучване върху PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизъм в ЕРα. Шведски колектив изследва тяхната роля при 260 болни със СЛЕ и 670 здрави индивиди и установява връзка между по-честите pp и xx генотипи и когнитивното увреждане. Авторите правят извода, че XbaI G (X) и PvuII C (P) алел са свързани с по-лека форма на СЛЕ, която се характеризира с кожни прояви, по-късно начало и по-слабо органно засягане [9]. Полски автори изследват само PvuII T/C полиморфизма на ЕРα и установяват по-ниска честота на неврологично засягане при пациенти с ювенилен лупус и PvuII C (P) алели [12]. Същевременно лонгитудинално проучване върху здрави жени над 65-годишна възраст установява, че алтернативните алели p и x се срещат по-често при жените, които развиват когнитивен дефицит, отколкото при останалите [17]. Неизяснен е въпросът, дали протективните свойства на алел P и X по отношение на неврологичните увреждания са специфични за пациентките с лупус. Възможно е те да предизвикват промени в естрогенния рецептор, които да предпазват нервната система по принцип от въздействието на ендогенни или екзогенни фактори.

Механизмите, чрез които двата полиморфизъма променят активността или експресията на ЕРα, не са известни. Herrington и сътр. изследват полиморфизма PvuII и установяват, че наличието на алел P увеличава свързващите участъци за транскрипционния фактор B-myb в гена за ЕРα при експериментални условия. B-myb може да усили транскрипцията на ЕРα или да предизвика производството на рецепторни изоформи с променени свойства. Авторите допускат, че наличието на алел P може да доведе до по-изразен отговор към естрогените в клетки, които експресират B-myb или свързани транскрипционни фактори [6]. Алтернативна хипотеза предполага, че е възможно полиморфизмите в интрон 1 да са тясно свързани с други ключови полиморфни участъци в гена за ЕРα (linkage disequilibrium), които биха могли да модулират отговора към естрогени [8]. Последни данни сочат, че полиморфните XbaI и PvuII участъци влияят върху синтеза на интерлевкини. Lu и сътр. установяват, че при болните със СЛЕ и генотип PpXx експресията на мРНК за интерлевкин-10 и интерлевкин-2 е значително по-висока в сравнение с контролите [14]. Необходими са допълнителни проучвания, които да изяснят механизмите, чрез които генетичните полиморфизми повлияват функцията на ЕРα и имунологичните фактори при СЛЕ.

В нашето проучване не се установи зависимост между изследваните генотипи и възрастта на изява на системния лупус. Наличието на алел P се свързва с по-късно начало на СЛЕ при европейци и азиатци [9, 13]. Различията между проучванията вероятно се дължат на етнически различия. Уместно е да се подчертае и различната честота на болните с ювенилен лупус в отделните изследвания. Полиморфизмите на естрогенния рецептор вероятно оказват различно влияние при болните, развили СЛЕ в детска или в зряла възраст, като се имат предвид различията в нивата на половите хормони през тези периоди.

Нашето изследване е първото в България и едно от малкото в света, които изследват връзката между полиморфизмите на естрогенния рецептор и клиничните прояви на СЛЕ. Основен недостатък на проучването е относително малката група здрави контроли. Поради това в теоретичен план липсата на разлика в алелното разпределение между здравите и болните жени може да се дължи на недостатъчната сила на изследването да установи дискретни различия между групите. Уместно е да се подчертае, че всички големи проучвания до момента не намират разлика в алелното разпределение на двата полиморфизъма между болни със СЛЕ и здрави контроли. Това означава, че тази хипотеза е малко вероятна.

В заключение нашето проучване установи, че полиморфните XbaI и PvuII участъци в гена за ERα модулират клиничната изява на СЛЕ. Необходими са допълнителни изследвания, които да установят конкретните механизми, чрез които по-рядко срещаните алели P и X влияят върху функцията на естрогенните рецептори. Практическият смисъл на тези проучвания е свързан с възможността за индивидуализиране на терапията съобразно конкретния генотип на пациентите, което би довело до по-добри резултати при лечението на СЛЕ.

Проучването е финансирано по проект № 26/2010 г. на МУ – София.

Библиография

1. Р а ш к о в, Р. Системен лупус ериматозус. – В: Системни заболявания на съединителната тъкан (колагенози). Й. Шейтанов, Р. Рашков (Ред.). С., ЦИМ, 1999, 5-6.
2. Т а н е в, Д., Р. Робева, Ф. Куманов, Р. Рашков и Зл. Коларов. Systemic lupus erythematosus и естрогени. – Ревматология, 18, 2010, № 4, 31-37.
3. B y n o e, M. S., C. M. Grimaldi et B. Diamond. Estrogen upregulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 2000, № 6, 2703-2708.
4. C e r v e r a, R., G. Espinosa et D. D'Cruz. Systemic lupus erytematosus: pathogenesis, clinical manifestations and diagnosis. – In: EULAR Compendium on Rheumatic Diseases. Johanes W. J. Bijlsma (Ed.). UK, London, BMJ Publishing Group and European League Against Rheumatism, 2009, 257-268.
5. C o s t e n b a d e r, K. H. et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. – Arthritis Rheum., 56, 2007, № 4, 1251-1262.
6. H e r r i n g t o n, D. M. et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. – Circulation, 105, 2002, № 16, 1879-1882.
7. I n u i, A. et al. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. – Clin. Rheumatol., 26, 2007, № 10, 1675-1678.
8. J a k i m i u k, A. et al. Prevalence of estrogen receptor alpha PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. – Folia Histochem. Cytobiol., 45, 2007, № 4, 331-338.
9. J o h a n s s o n, M. et al. Oestrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus. – Ann. Rheum. Dis., 64, 2005, № 11, 1611-1617.
10. K a s s i, E. et P. Moutsatsou. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. – J. Biomed. Biotechnol., 2010, ID 317452.
11. K i m, W. U. et al. Effect of oestrogen on T cell apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. – Clin. Exp. Immunol., 161, 2010, № 3, 453-458.
12. K i s i e l, B. M. et al. Differential association of juvenile and adult systemic lupus erythematosus with genetic variants of oestrogen receptors alpha and beta. – Lupus, 20, 2011, № 1, 85-89.
13. L e e, Y. J. et al. Association of the oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with disease onset in systemic lupus erythematosus. – Ann. Rheum. Dis., 63, 2004, № 10, 1244-1249.
14. L u, Z. M. et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with cytokine genes expression in systemic lupus erythematosus. – Croat Med J. 50, 2009, № 2, 117-123.
15. M c M u r r a y, R. W. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. – Int. Immunopharmacol., 1, 2001, № 6, 995-1008.
16. W a n g, J., M. Nuite et T. E. McAlindon. Association of estrogen and aromatase gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. – Lupus, 19, 2010, № 6, 734-740.
17. Y a f f e, K. et al. Estrogen receptor 1 polymorphisms and risk of cognitive impairment in older women. – Biol. Psychiatry, 51, 2002, № 8, 677-682.

Постъпила за печат на 1 август 2011 г.

Адрес за кореспонденция:
Д-р Д. Танев
Клиника по ревматология
Медицински университет
ул. "Урвич" № 13
1612 София
e-mail: dobri_tanev@yahoo.com

Address for correspondence:
D. Tanev, M. D.
Clinic of Rheumatology
Medical University
13, Urvitch Str.
Bg – 1612 Sofia
e-mail: dobri_tanev@yahoo.com