

Asociácia HLA-DR a -DQ aliel s pemphigus vulgaris v slovenskej populácii

Párnická Z.¹, Rakovan N.², Švecová D.², Buc M.¹

¹ Imunologický ústav LFUK, Bratislava,
prednosta prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

² Dermatovenerologická klinika LFUK, Bratislava
prednosta prof. MUDr. Mária Šimaljaková, PhD.

Súhrn

Asociácia HLA-DR a -DQ aliel s pemphigus vulgaris v slovenskej populácii

Pemphigus vulgaris (PV) je autoimunitná choroba, ktorá sa spája s genetickou predispozíciou, na ktorú sa najväčšou mierou podieľajú gény HLA-komplexu. Cieľom našej práce bolo zistiť, či táto choroba v slovenskej populácii, podobne ako je tomu v iných kaukazoidných populáciach, je tiež asociovaná s alelami HLA-komplexu. V súbore 32 pacientov s PV sme stanovili frekvencie HLA-DRB1 a -DQB1 aliel a porovnávali so zdravou populáciou. Zistili sme štatisticky signifikantnú pozitívnu asociáciu s alelami DRB1*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, $P < 0,001$) a DRB1*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, $P < 0,001$). Alely DQB1*03 a DQB1*05 sa vyskytovali častejšie tiež, ale signifikantnú úroveň nedosiahli. Frekvencia alely DQB1*06 bola u pacientov s PV, v porovnaní s kontrolou skupinou, signifikantne nižšia (3,12 % vs. 20,61 %; OR = 0,12, $P = 0,002$). Nižšie, ale štatisticky nesignifikantné, alebo frekvencie sme zaznamenali tiež pri DRB1*11 a DRB1*15. Uvedené výsledky sú v súlade s údajmi uvádzanými v literatúre a prispievajú tak k celkovej genetickej charakteristike choroby.

Kľúčové slová: pemphigus vulgaris – HLA a choroby – slovenská populácia

Summary

Association of HLA-DR and -DQ Alleles with Pemphigus Vulgaris in Slovak Population

Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune disease with genetic predisposition associated mostly with HLA complex alleles. We examined whether this holds true for Slovak population similarly to other Caucasian populations. In 32 patients the frequency of HLA-DRB1 and DQB1 alleles was examined and compared to healthy population. The statistically significant positive association with alleles DRB1*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, $P < 0,001$) and DRB1*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, $P < 0,001$) was found. DQB1*03 and DQB1*05 alleles were more frequent but not on a significant level. DQB1*06 were significantly lower in PV patients in comparison with control group (3,12 % vs. 20,61 %; OR = 0,12, $P = 0,002$). Lower, statistically non-significant frequency was noted for DRB1*11 and DRB1*15 alleles. These results correspond well with the literature and help to overall genetic characteristics of the disease.

Key words: pemphigus vulgaris – HLA complex and diseases – Slovak population

ÚVOD

Pemphigus je označenie pre skupinu chorôb, ktoré sa vyznačujú pluzgierovými prejavmi na koži a slizničiach. Patria sem tri príbuzné choroby – *pemphigus vulgaris*, *pemphigus foliaceus* a paraneoplastický pemfigus.

Pemphigus vulgaris (PV) je najťažšia forma pemfigu-

a pred érou používania systémovej glukokortikoidovej terapie bol skoro vždy fatálny. Klinicky sa manifestuje tvorbou vezikúl na koži a slizničiach. Príčinou vytvárania pluzgierových prejavov sú protilátky, ktoré sú namierené proti intercelulárnym adhezívnym molekulám, konkrétnie proti desmogleínu 3 a desmogleínu 1 (Dsg3 a Dsg1). Okrem anti-Dsg3 a anti-Dsg1 protilátok sa na imunopatogenéze choroby podieľajú aj iné protilátky,

Podakovanie

Práca vznikla na základe finančnej podpory pri riešení grantu MŠ SR VEGA č. 1/0145/09 a APVV č. SK-CZ 0015-07

najmä proti acetylcholínovému receptoru $\alpha 9$ a pemfaxínu (anexín 31) (13). Tieto receptory sa podielajú na regulácii koncentrácie intracelulárneho Ca^{2+} iónu, ktorý je nevyhnutný pre polymerizáciu aktínu, deju, ktorý sa odohráva pri spájaní sa keratinocytu s keratinocytom; vytváranie desmozómov nasleduje až po vytvorení ich stabilného kontaktu (5, 17).

Pemphigus vulgaris patrí medzi autoimunitné choroby, o ktorých je známe, že sa vyvíjajú na genetickom pozadí. Každá autoimunitná choroba je podmienená viacerými génnimi, ide v podstate o súbor génov, z ktorých každý svojim dielom prispieva ku genetickej predispozícii, ktorá sa realizuje pod vplyvom určitého environmetálneho vyvolávateľa. V rámci genetickej predispozície medzi gény, ktoré sú najvýznamnejšie patria gény HLA-komplexu; ich podiel je až 30–40 % (2, 8, 10). Asociácie medzi HLA-alelami, resp. molekulami a chorobami sú už dobre známe a mnohé z nich sa už využívajú aj pre účely klinickej praxe. HLA-alely sa podielajú aj na predispozícii k PV ako o tom svedčia početné údaje z literatúry, avšak nie slovenskej. Cieľom našej práce bolo preto zistiť asociáciu PV s alelami HLA-komplexu na vzorke pacientov slovenskej populácie.

MATERIÁL A METÓDY

Súbor chorých s *pemphigus vulgaris* tvorilo 32 nepríbuzných pacientov kaukazoidnej populácie, ktorí pochádzali z viacerých oblastí Slovenska. Vek pacientov bol v priemere 56 rokov, najmladší bol 23-ročný a najstarší 83-ročný, pomer žien a mužov v sledovanom súbore bol 1,6 : 1; priemerný vek prvých prejavov choroby bol 47 rokov. Diagnóza sa určila na základe histologického vyšetrovania a u 20 pacientov sa potvrdila aj priamym imunoflu-

orescenčným vyšetronením. Kontrolnú populáciu tvorilo 130 (pre určenie HLA-DRB1 aleli), resp. 143 (pre určenie HLA-DQB1 aleli) nepríbuzných dobrovoľných jedincov kaukazoidnej populácie, ktorých sme na našom pracovisku vyšetrali v rámci populačno-genetickej štúdie (4). Aj pacienti aj zdraví dobrovoľníci sa vyšetrali tou istou metódou a primermi, ktoré pochádzali od tej istej firmy.

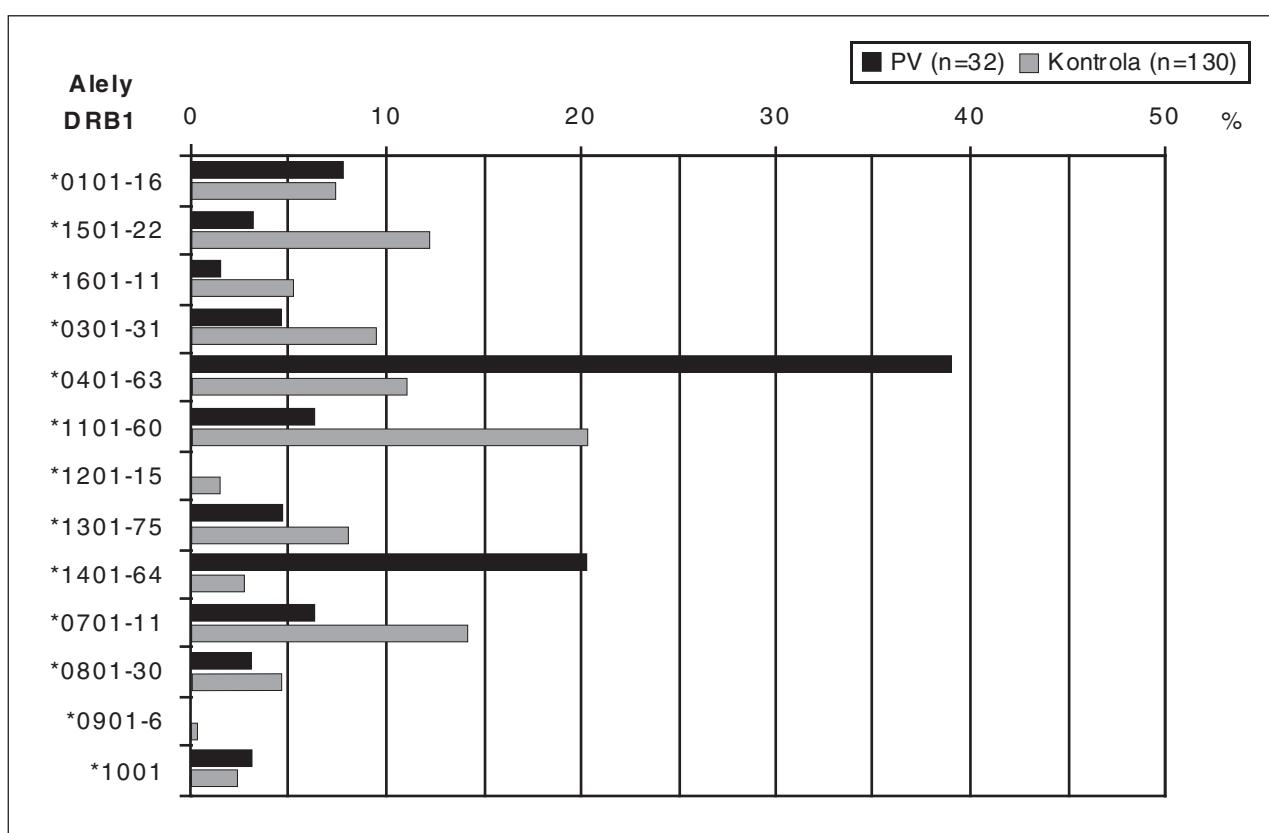
Typizáciu HLA-aleli triedy II sme robili pomocou techniky PCR-SSP (polymerázová reakcia so sekvenčne špecifickými primermi). Táto technika zahrňuje izoláciu genómovej DNA, amplifikáciu 2., príp. 2. a 3. exónu príslušnej alely a napokon vizualizáciu. Amplifikáciu polymorfnej oblasti HLA-génov sme uskutočňovali pomocou kommerčne dostupných sekvenčne špecifických primerov Olerup SSPTM (Švédsko) pre nízko-rozlišovaci (low resolution) techniku (14, 15); používali sme 23 HLA-DR párov a 8 HLA-DQ páarov primerov. Nízko-rozlišovacia technika umožňuje určovať len skupinu príbuzných aleli, ale nie jednotlivé alely; napr. určovali sme DRB1*01 skupinu, ktorá v čase získavania výsledkov zahŕňala až 16 aleli (tieto sa dajú identifikovať vysokorozlišovacou technikou – „high resolution“).

Štatistickú analýzu rozdielov medzi frekvenciami jednotlivých aleli sme v oboch súboroch robili pomocou Fisherovho exaktného testu (štatistický počítačový program INSTAT 3, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Vypočítali sme hodnotu P, ktorá udáva pravdepodobnosť platnosti nulovej hypotézy predpokladajúcej, že medzi vyšetrovanou chorobou a znakom (alelou) neexistuje nijaká asociácia. Za hranicu štatistickej významnosti sa považuje $P = 0,05$. Táto hodnota sa zvykne korigovať podľa Bonferoniho (P_c), teda vynásobením čísla P počtom aleli, resp. skupín aleli, ktoré na danom lokuse možno určiť (3). V tabuľkách uvádzame aj hodnoty pravdepodobnosti P_c (hranicou štatistickej významnosti je $P_c = 0,05$). Pomer šancí (odds ratio – OR) sme vypočítali pomocou rovnaké-

Tab. 1. Frekvencie HLA-DRB1 aleli u pacientov s *pemphigus vulgaris* a u zdravých osôb

HLA-DRB1	PV (N- 32)		Kontrola (N - 130)		P	P_c	OR	95% CI
	Počet	%	Počet	%				
*0101-16	5/64	7,81	19/260	7,31	0,796	n.s.	1,075	0,39 - 3,00
*1501-22	2/64	3,12	32/260	12,31	0,0245	n.s.	0,2227	0,05 - 0,95
*1601-11	1/64	1,56	14/260	5,38	0,3193	n.s.	0,279	0,04 - 2,16
*0301-31	3/64	4,69	25/260	9,62	0,3191	n.s.	0,4623	0,14 - 1,58
*0401-63	25/64	39,06	29/260	11,16	< 0,0001	< 0,001	5,106	2,71 - 9,62
*1101-60	4/64	6,25	53/260	20,38	0,0058	n.s.	0,2520	0,09 - 0,72
*1201-15	0/64	0,00	4/260	1,53	1,00	n.s.	0,4419	0,02 - 8,32
*1301-75	3/64	4,69	21/260	8,07	0,436	n.s.	0,5597	0,16 - 1,94
*1401-64	13/64	20,31	7/260	2,69	< 0,0001	< 0,001	9,213	3,50 - 24,23
*0701-11	4/64	6,25	37/260	14,23	0,215	n.s.	0,4018	0,14 - 1,17
*0801-30	2/64	3,12	12/260	4,62	1,00	n.s.	0,6667	0,14 - 3,06
*0901-6	0/64	0,00	1/260	0,38	1,00	n.s.	1,341	0,05 - 33,33
*1001	2/64	3,12	6/260	2,31	0,659	n.s.	1,366	0,27 - 6,92

Legenda: P_c – korigovaná P-hodnota, OR – pomer šancí (odds ratio), CI – interval spoľahlivosti (confidence interval), N – počet členov súboru, počet - zastúpenie daných aleli v súbore, % – percentuálne zastúpenie daných aleli v súbore, n.s. – hodnota nebola štatisticky signifikantná



Obr. 1. Porovnanie frekvencie HLA-DRB1-aliel u chorých s pemphigus vulgaris so zdravou populáciou.

ho počítačového programu Instat. OR vyjadruje silu štatisticky signifikantnej asociácie - čím je asociácia silnejšia, tým je OR vyššie ako 1; naopak, čím OR je menšie ako 1, tým silnejšia je negatívna asociácia.

VÝSLEDKY

V súbore pacientov sme určovali 13 skupín HLA-DRB1 aleli. Ich alelová frekvencia sa pohybovala od 0,00 % až po 39,06 % (tab. 1, obr. 1). Oproti kontrolnej skupine štatisticky veľmi významne zvýšenú frekvenciu mali alely DRB1*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, P < 0,0001, Pc < 0,001) a DRB1*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, P < 0,0001, Pc < 0,001). Naopak, zníženú frekvenciu mali ale-

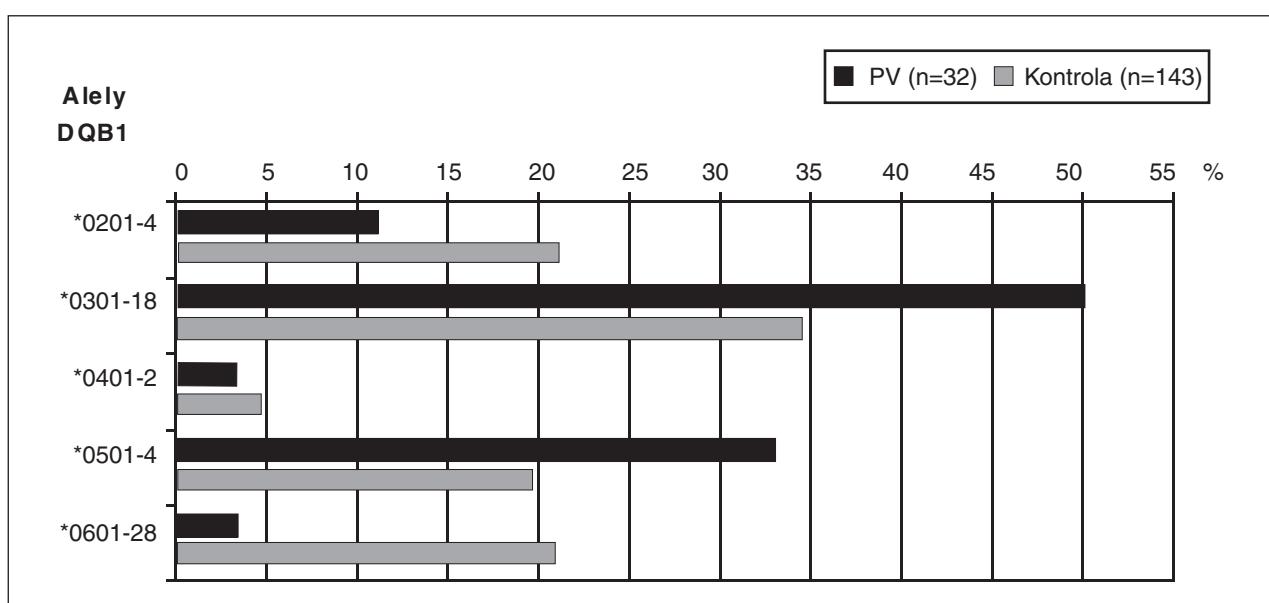
ly DRB1*15 (3,12 % vs. 12,31 %, OR = 0,2, P = 0,024, Pc = 0,318) a DRB1*11 (6,25 % vs. 20,38 %, OR = 0,25, P = 0,0058, Pc = 0,0754), ale tieto rozdiely neboli štatisticky signifikantné.

Frekvencie HLA-DQB1 aleli u pacientov s PV, v porovnaní so zdravými, uvádzame v tabuľke 2 a na obrázku 2; pohybovali sa od 3,12 % až po 50,00 %. Štatisticky signifikantne zvýšený výskyt sme pozorovali pri alelách DQB1*03 a DQB1*05, avšak po korekcii podľa Bonferoniego Pc nedosahovali úroveň 0,05 (DQB1*03 = 50,00 % vs. 34,26 %; OR = 1,9, P = 0,022, Pc = 0,1105 a DQB1*05 = 32,81 % vs. 19,58 %; OR = 2,0, P = 0,029, Pc = 0,146). Na druhej strane sme u pacientov, oproti kontrolnej skupine, zaznamenali znížený výskyt alely DQB1*06; štatistická signifikantnosť nálezu zostala zachovaná aj po korekcii (3,12 % vs. 20,63 %; OR = 0,12, P =

Tab. 2. Frekvencie aleli HLA-DQB1 u pacientov s pemphigus vulgaris a zdravých osôb

HLA-DQB1	PV (N- 32)		Kontrola (N- 143)		P	P _c	OR	95 % CI
	Počet aleli	%	Počet aleli	%				
*0201-4	7/64	10,94	60/286	20,98	0,078	n.s.	0,4626	0,2 - 1,07
*0301-18	32/64	50,00	98/286	34,26	0,0221	n.s.	1,918	1,11 - 3,17
*0401-2	2/64	3,12	13/286	04,55	1,0000	n.s.	0,6774	0,15 - 3,08
*0501-4	21/64	32,81	56/286	19,58	0,0292	n.s.	2,006	1,10 - 3,65
*0601-28	2/64	3,12	59/286	20,63	0,0004	0,002	0,1241	0,02 - 0,52

Legenda: P_c – korigovaná P-hodnota, OR – pomer šancí (odds ratio), CI – interval spoľahlivosti (confidence interval), N – počet členov súboru, % – percentuálne zastúpenie daných aleli v súbore, n.s. – hodnota nebola štatisticky signifikantná



Obr. 2. Porovnanie frekvencie HLA-DQB1-aleli u chorých s pemphigus vulgaris so zdravou populáciou.

0,0004, $P_c = 0,002$). Znížená, aj keď nie signifikantne, bola aj alela DQB1*02 (10,94 % vs. 20,98 %; OR = 0,46, $P = 0,078$, $P_c = 0,390$).

DISKUSIA

Pemfigus vulgaris (PV) je autoimunitná choroba, ktorej nástup a progresia závisí od interakcie viacerých známych aj neznámych faktorov. Patria medzi ne lieky, strava, UV žiarenie, vírusy a iné faktory, pričom chorobné procesy vyvolajú či podporujú iba u jedincov, ktorí majú pre danú chorobu genetickú predispozíciu (1, 2, 6, 18).

Na genetickej predispozícii PV sa najväčšou mierou podielajú gény HLA-komplexu, ktoré sa považujú za dominujúce predipozičné genetické faktory; z nich sú to najmä HLA-DR alely, ktoré kódajú molekuly schopné, v porovnaní s inými HLA-molekulami, najúčinnejšie indukovať (auto)imunitné procesy (2, 5, 16). PV sa vyskytuje častejšie u osôb židovského pôvodu s genetickými základmi Ashkenáziho kmeňa (4 až 10-krát častejšie ako v kaukazoidnej populácii), a preto prvé asociácie medzi HLA-systémom a PV sa hľadali práve u nich. Tieto štúdie odhalili asociáciu choroby s molekulou HLA-DR4; neskôr sa asociácia potvrdila DNA-typizáciou a navyše sa asociácia spresnila – ide o asociáciu s alelou HLA-DRB1*0402. Podobné štúdie v kaukazoidnej a v iných populáciach tiež zistili asociáciu s HLA-DR4 a -DQ5 (kóduje ju alela HLA-DQB1*0503) (9, 6, 11). HLA-DQB1*0503 je vo väzbovej nerovnováhe s alelami zo skupiny DRB1*14. Vyšetrenie chorých s PV súčasne odhalilo, že títo nemali molekulu HLA-DR3 (9, 11, 12), takže by mohla pôsobiť ako protektívny faktor.

Problematike asociácie medzi HLA-alelami a PV sa na Slovensku zatiaľ nikto nevenoval, čo nás viedlo, k tomu, aby sme takúto štúdiu urobili. Zistili sme silnú, štatisticky preukázanú, pozitívnu asociáciu *pemphigus vulgaris* s alelami DRB1*14 a DRB1*04. Alely DQB1*03 a DQB1*05 sa vyskytovali sice tiež častejšie, ale odchýlka ich frekvencie od zdravej populácie po korekcii nedosiahla signifikantnú úroveň. Na druhej strane frekvencia aleli DQB1*06 u pacientov, v porovnaní s kontrolou skupinou, bola signifikantne nižšia, takže môže mať protektívny charakter vzhľadom na vývoj PV. Nižšie frekvencie sme zaznamenali tiež u DRB1*11 a DRB1*15, ale tento nález neboli štatisticky signifikantný.

Pozitívna asociácia DRB1*04 a DRB1*14 aleli s PV, ktorú sme zistili v našej štúdii, sa zistila aj v iných populáciách, napr. u Španielov, Francúzov, Talianov a iných (7, 11, 12), takže našimi výsledkami sme iba potvrdili všeobecne platnú asociáciu medzi týmito alelami a PV. Podobne negatívne asociácie aleli DQB1*06, HLA-DRB1*11 a HLA-DRB1*15 s *pemphigus vulgaris*, ktoré sme pozorovali v našej štúdii, udávajú aj iní autori (1, 6, 9). Na druhej strane sme nepotvrdili negatívnu asociáciu medzi PV a HLA-DRB1*03, ktorá kóduje molekulu HLA-DR3, i keď náznak jej zniženej frekvencie tu je a je možné, že pri vyšetrení väčšej skupiny pacientov, čo je dosť ľahké vzhľadom na nízku prevalenciu choroby, sa táto tendencia pretvorí do štatisticky signifikantnej podoby.

Výsledky, ktoré v práci prezentujeme, sme získali typizáciou na úrovni „low resolution“ a možno ich považovať len za predbežné. Je veľmi pravdepodobné, že pri podrobnejšej analýze vysoko-rozlišovacou technikou (high resolution), dospejeme k presnej identifikácii konkrétnej alely zodpovednej za genetickú predispozíciu, čo je v programe našej ďalšej výskumnej práce.

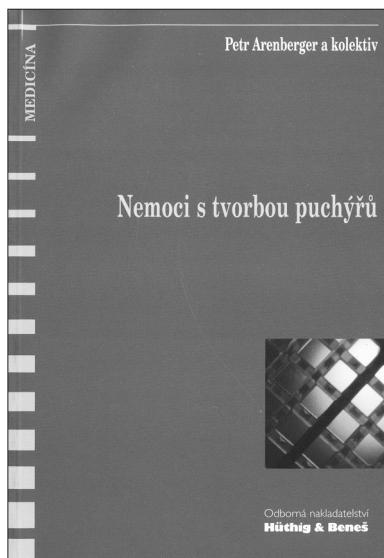
LITERATÚRA

1. BIROL, A., ANADOLU, RY., TUTKAK, H., GURGEY, E. HLA-class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol*, 2002, 41, p. 79-83.
2. BUC M. *Autoimunita a autoimunitné choroby*. Bratislava: Veda 2005; 493 s.
3. DUNN, OJ. Multiple comparisons among means. *Am J Statist Assoc*, 1961, 56, p. 52-64.
4. FAZEKAŠOVÁ, H., SHAWKATOVÁ, I., BUC, M., FERENČÍK, S.: Frekvencia alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 v slovenskej populácii. *Bratisl lek Listy*, 1998, 99, 11, p. 601-604.
5. FRIEDMAN A. HLA and Dermatological Disease In LECHLER, R., WARRENS A. *HLA in Health and Disease*. 2. vyd., Academic Press, London, 2000, p. 365-369. ISBN 0 12 440315 8.
6. GLORIO, RR., RODRIGUEZ COSTA, G., HAAS, R., et al. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Argentinian patients with pemphigus vulgaris. *J Cutan Med Surg*, 2002, 6, 5, p. 422-426.
7. GONZALEL-ESCRIBANO, MF., JIMENEZ, G., WALTER, K., et al. Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*, 1998, 52, p. 275.
8. KREJSEK, J., KOPECKÝ O. *Klinická imunologie*. Pardubice: Nucleus, 2004, s. 302. ISBN 80-86225-50-X.
9. LEE, E., LENDAS, KA., CHOW, S., et al. Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. *Human Immunology*, 2007, 68, p. 630-643.
10. LI, N., LIU, Z., HILARIO-VARGAS, J., DIAZ LA. Bullous Skin Diseases: *Pemphigus Pemphigoid*. In ROSE, NR., MACKAY, IR. *The Autoimmune Diseases*. Elsevier Academic Press, 4th Ed., 2006, p. 789-794.
11. LOISEAU, P., LECLEACH, L., PROST, C., et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun*, 2000, 15, p. 67-73.
12. LOMBARDI, ML., MERCERO, O., RUOCCHI, V. et al.: Common human leucocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol*, 1999, 113, p. 107-110.
13. Nguyen, VT., Assane Ndoye, A., Grado, SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 29466-29476.
14. OLERUP, O., ALDNER, A., FODGELL, A. HLA-DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 1993, 41, s. 119-134.
15. OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 1992, 39, 5, p. 225-235.
16. SÁENZ-CANTELE, AM., FERNÁNDEZ-MESTRE, M., MONTAGNANI, S., et al. HLA-DRB1*0402 haplotypes without DQB1*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris. *Tissue antigens*, 2007, 69, s. 318-325.
17. ŠVECOVÁ, D. *Pemphigus*. Bratislava: Bonus, 2009, 106 s.
18. TUR, E., BRENNER, S. Contributing exogenous factors in pemphigus. *Int J Dermatol*, 1997, 36, p. 888-893.

Došlo do redakce: 20. 1. 2010

MUDr. Zuzana Párnická
Imunologický ústav LF UK
Odborárske nám. 14
813 72 Bratislava 1
SR

E-mail: zuzana.parnicka@fmed.uniba.sk



NEMOCI S TVORBOU PUCHÝŘŮ

Petr Arenberger

Sdělovací technika, spol.s r.o. 1999, 80 str.

ISBN: není uvedeno

Cena: 72,- Kč

Vazba brožovaná

Anotace:

Cílem publikace je shrnutí klasických i moderních poznatků o některých chorobách s tvorbou puchýřů. Je užitečným literárním zdrojem pro postgraduální studium v dermatologii a příbuzných oborech, rozšiřujících literaturu pro studenty medicíny a pro všechny, kteří se ve své každodenní praxi s pacienty s vezikulami a bulami na kožním povrchu setkávají a jsou postaveni před otázku diferenciální diagnostiky a léčby.

Objednávky zasílejte e-mailem nebo poštou: Nakladatelství a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i jméno časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli