

Porównanie poziomu transkryptu genu dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej typu pierwszego (*HSD17 β 1*) u kobiet chorych na toczeń rumieniowaty układowy (SLE) i kobiet zdrowych

Aleksander J. STRUGAŁA¹

Alicja E. GRZEGORZEWSKA²

Zofia NIEMIR²

Paweł P. JAGODZIŃSKI¹

¹Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik:
Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński

²Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik:
Prof. dr hab. med. Andrzej Oko

Słowa kluczowe:

- SLE
- estrogeny
- 17 β -estradiol
- HSD17 β 1

Key words:

- SLE
- estrogens
- 17 β -estradiol
- HSD17 β 1

Wstęp. Toczeń rumieniowaty układowy (SLE) jest chorobą autoimmunologiczną tkanki łącznej. Mechanizm choroby opiera się na nieprawidłowym działaniu układu immunologicznego. Zaburzone funkcjonowanie dotyczy m.in. grupy jednojądrzastych komórek krwi (PBMC). Etiologia SLE nie jest w pełni poznana. Wśród wielu czynników, wpływających na rozwój choroby wyróżnia się m.in. estrogeny, w tym najbardziej aktywny, 17 β -estradiol (E2). E2 syntetyzowany jest przy udziale enzymu, dehydrogenazy hydroksysteroidowej typu 1 (*HSD17 β 1*). Wytwarzany przez gonady E2 nasila odpowiedź układu immunologicznego. E2 może być wytwarzany również pozagonadalnie. Jego działanie obejmuje wówczas najbliższe okolice tkanki produkującej hormon.

Cel pracy. Celem pracy było porównanie względnej ilości mRNA genu *HSD17 β 1* w komórkach PBMC między grupą kobiet z SLE i grupą kobiet zdrowych.

Materiały i metody. Badania zostały przeprowadzone u 19 kobiet z SLE i 16 kobiet zdrowych. Porównano względną ilość transkryptów genu *HSD17 β 1* w stosunku do mRNA genu referencyjnego deaminazy porfobilinogenu (*PBGD*), wykorzystując łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym.

Wyniki. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie transkryptu genu *HSD17 β 1* w komórkach PBMC między grupą kobiet chorych na SLE i grupą kontrolną. (NEFROL. DIAL. POL. 2013, 17, 61-64)

Comparison of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*HSD17 β 1*) gene transcript level in women with and without Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Introduction. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of connective tissue. SLE mechanism is based on dysfunctional immune response. One of dysfunctional parts of immune system are Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). Etiology of SLE is not well understood. Among many factors that have an influence on the course of SLE are estrogens and especially 17 β -estradiol (E2) which is the most active compound among estrogens. E2 is synthesized by 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*HSD17 β 1*). E2 produced by gonads is responsible for intensify of the immune response. However E2 can be produced by many tissues different than ovaries. This E2 acts on local level.

Aim of study. In this study we analyzed relative amount of *HSD17 β 1* mRNA in PBMC in group of women with SLE and group of healthy controls.

Materials and methods. Nineteen females with SLE and sixteen healthy controls were included into the study. We have compared relative mRNA amount of *HSD17 β 1* with mRNA level of porphobilinogen deaminase (*PBGD*) reference gene using quantitative real time polymerase chain reaction.

Results. In this study we did not observed differences in relative amount of *HSD17 β 1* mRNA level in PBMC between group of women with SLE and group of healthy controls. (NEPHROL. DIAL. POL. 2013, 17, 61-64)

Wstęp

Toczeń rumieniowaty układowy (*ang. Systemic Lupus Erythematosus* – SLE) jest chorobą autoimmunologiczną tkanki łącznej, która dotyka 0,04-0,2% światowej populacji [9,14]. Charakteryzuje się przewlekłym przebiegiem z okresami nawrotów i remisji. SLE może atakować wiele narządów i tkanek, w tym serce, nerki, płuca, stawy, skórę i układ nerwowy. Nieleczony, w skrajnych przypadkach

może prowadzić nawet do śmierci. Rozpoznanie SLE jest trudne ze względu na podobieństwo objawów do innych jednostek chorobowych. W celu oceny aktywności choroby stosuje się skalę SLEDAI (*ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) [4]. Do stwierdzenia choroby potrzebne jest jednoczesne wystąpienie co najmniej 4 objawów (Tab. I).

SLE jako choroba autoimmunologiczna ma swoje źródło w zaburzoną funkcjono-

Adres do korespondencji:

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań
Prof. dr hab. Paweł Jagodziński
e-mail: pjagodzi@ump.edu.pl

waniu układu odpornościowego [19]. U osób zdrowych występuje zjawisko autotolerancji, które zapobiega zwalczaniu własnych tkanek przez układ odpornościowy. U chorych na SLE można wykryć autoprzeciwciała, które skierowane są przeciwko autoantygenom [17]. Obecność autoprzeciwciała w organizmie chorego może być stwierdzona nawet kilka lat przed wystąpieniem objawów klinicznych i postawieniem diagnozy [15].

Za wytworzenie odpowiedzi immunologicznej odpowiada szereg komórek, które należą do grupy jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (*ang. peripheral blood mononuclear cell* – PBMC). Należące do PBMC komórki prezentujące antygen (*ang. antigen presenting cell* – APC) umożliwiają limfocytom T rozpoznanie antygeny i zapoczątkowanie swoistej odpowiedzi immunologicznej. Uważa się, że ukryte epitopy, na które reaguje układ immunologiczny w patogenezie SLE, pojawiają się w wyniku zaburzenia procesu usuwania resztek komórek apoptotycznych, które u zdrowych osób są fagocytowane przez makrofagi [2]. Makrofagi wydzielają cytokiny hamując odpowiedź immunologiczną [13,16]. Prezentacja autoantygenów aktywuje limfocyty T, które w odpowiedzi wytwarzają cytokiny, indukujące proliferację limfocytów B do komórek plazmatycznych wytwarzających przeciwciała.

Etiologia SLE nie jest w pełni poznana. Jako przyczynę choroby podaje się czynniki środowiskowe, genetyczne, epigenetyczne i hormonalne [14]. Do czynników środowiskowych zalicza się między innymi niektóre leki, pyły krzemionkowe, sole metali ciężkich czy promieniowanie UV [1,5,8]. Genetyczne podłoże SLE jest bardzo złożone. Obecnie znanych jest ok. 100 genów zaangażowanych w rozwój choroby [18]. Do głównych modyfikacji epigenetycznych powiązanych z etiologią SLE zalicza się zmiany w poziomie metylacji DNA promotorów niektórych genów, jak np. *CD70* i *CD40L* oraz kowalencyjne modyfikacje histonów [10,11]. Istnieje również związek między etiologią SLE a żeńskimi hormonami płciowymi, estrogenami [6,7,17]. Badania kliniczne wskazują, że SLE dotyka głównie kobiety w okresie przedmenopauzalnym. U kobiet po menopauzie objawy SLE mają łagodniejszy charakter. Mężczyźni natomiast chorują do dziesiątej części rzadziej. Wpływ estrogenów na rozwój SLE potwierdza także fakt, iż wśród dzieci w wieku przed okresem dojrzewania płciowego, stosunek zachorowań dziewczynki i chłopców jest mniejszy niż w przypadku osób dorosłych.

Estrogeny, oprócz dużej roli w cyklu menstruacyjnym kobiet, są także odpowiedzialne za wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej [15]. Oddziałują one na komórkę za pomocą receptorów estrogenowych (*ang. estrogen receptor* – ER), wśród których wyróżnia się receptory błonowe i wewnątrzkomórkowe. Do grupy tych ostatnich należą ER α i ER β . Estrogeny łączą się z ER, wnikają do jądra komórkowego i oddziałują z elementami promotorowymi genów modyfikując ich ekspresję. Obecność ER wykazano m.in. w limfocytach, co sugeruje wpływ E2 na rozwój SLE. Badania na myszach z wyłączonym genem *ER α* wykazały, że zmniejszona poziom tego receptora

Tabela I

Kryteria SLE wg American College of Rheumatology – ACR.

Zmodyfikowano wg: Rozprawa doktorska mgr. Kozłowska A.: Analiza ekspresji genów *FYN*, *CD70* i *PRF1* w limfocytach CD4+ u osób z toczniem rumieniowatym układowym oraz w liniach komórkowych limfocytów T. Poznań 2009.

SLE criteria according to American College of Rheumatology (ACR).

Adapted from: Doctoral thesis MCs Kozłowska A.: *FYN*, *CD70* and *PRF1* gene expression analysis in lymphocytes T CD4+ in patients with systemic lupus erythematosus and in lymphocyte T cell lines.

| Objaw | Opis |
|---|---|
| 1. wysypka na twarzy | występująca na twarzy w kształcie motyla |
| 2. rumień krążkowy | zmiany rumieniowate z rogowaceniem, zaczopowanie gruczołów łojowych |
| 3. nadwrażliwość skóry na UV | wysypka skórna pod wpływem światła słonecznego |
| 4. owrzodzenia błon śluzowych | ubytki śluzówki jamy ustnej |
| 5. zapalenia i bóle stawów | dotyczy co najmniej dwóch stawów, bez zmian w obrazie RTG |
| 6. zapalenia błon surowiczych | zapalenie opłucnej lub osierdzia |
| 7. zmiany zapalne w nerkach | białkomocz > 0,5g na dobę, erythrocyturia (>5wpw), leukocyturia (>5wpw), lub obecność walczków w moczu |
| 8. zmiany neuropsychiatryczne | napady drgawek lub psychoza (po wykluczeniu przyczyn polekowych, metabolicznych, moczniczy) |
| 9. zaburzenia hematologiczne | niedokrwistość hemolityczna z retikulocytozą lub limfopenia (poniżej 1500 w 1 mm3) lub leukopenia (poniżej 4000 w 1mm3) lub trombocytopenia (poniżej 100 000 w 1mm3) |
| 10. zaburzenia immunologiczne | obecność komórek LE lub przeciwciał przeciw dsDNA, lub przeciwciał anty-Sm, lub fałszywie dodatnie serologiczne odczyny kilowe przy ujemnym teście na immobilizację krętków |
| 11. występowanie przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) | w mianie nie niższym niż 80 |

skutkuje złagodzeniem objawów SLE [20]. Analiza mysich modeli SLE pozbawionych gonad, potwierdziła wpływ estrogenów na przebieg choroby [20]. Estrogeny, poprzez zwiększenie poziomu interleukin i aktywację limfocytów B, związane są także ze wzrostem produkcji przeciwciał IgG, których podwyższoną ilość odnotowuje się u chorych na SLE [15].

Najbardziej aktywnym biologicznie estrogenem jest 17 β -estradiol (E2). E2 jest produkowany głównie przez jajniki, jednak jego synteza może przebiegać również w innych tkankach, tak u kobiet, jak i u mężczyzn [17]. Wytwarzany pozagonadalnie E2 działa przede wszystkim w miejscu jego powstawania [17]. Istnieją doniesienia, że komórki układu immunologicznego mogą być zdolne do produkcji hormonów steroidowych. Limfocyty wykazują obecność transkryptu genu dehydrogenazy hydroksysteroidowej typu 1 (*ang. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1* – *HSD17 β 1*), którego białkowy produkt, w obecności NADPH jako kofaktora, odpowiedzialny jest za redukcję estronu (E1) do E2 [21]. Istnieje zatem możliwość produkcji E2 przez limfocyty i jego lokalnego działania, zmieniającego m.in. ekspresję genów w samych limfocytach. Mechanizm ten mógłby mieć znaczenie w etiopatogenezie SLE.

W naszej pracy zbadaliśmy różnice w poziomie transkryptu genu *HSD17 β 1* w komórkach PBMC u osób chorych na SLE i osób należących do grupy kontrolnej.

Materiały i metody

Pacjentki i grupa kontrolna

Grupa badana składała się z 19 pacjentek chorych na SLE. Osoby należące do tej grupy nie przyjmowały leków cytostatycznych przez co najmniej 3 miesiące oraz

glikokortykosteroidów przez co najmniej 24 godz. przed pobraniem krwi do badań. Badane kobiety były w przedziale wiekowym 19-61 lat ze średnią 38,5 ($\pm 12,9$) lat. Pięć pacjentek wykazywało się stopniem 5D przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii toczniowej, gdzie wymagana jest hemodializa. Reszta pacjentek była w łagodniejszym stadium choroby. Pięć kobiet wykazywało się wyższym niż 8 punktów w skali SLEDAI stadium SLE. Osiem pacjentek z grupy badanej nie miesiaćkowało.

Krew obwodowa grupy kontrolnej, liczącej 16 zdrowych kobiet, została pozyskana z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu. Kobiety były w wieku między 21 a 37 rokiem życia, gdzie średnia grupy wynosiła 28,1 ($\pm 5,2$) lat. Zarówno grupa pacjentek, jak i grupa kontrolna, należały do populacji Kaukaskiej.

Zgodę na przeprowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Izolacja komórek PBMC z krwi obwodowej

Z 1ml krwi obwodowej izolowano PBMC wykorzystując wirowanie w gradiencie gęstości z użyciem Ficoll® Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Izolacja PBMC odbywała się w przeciągu 24 godz. od momentu pobrania krwi. Wyizolowane PBMC oczyszczane były przy użyciu soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (*ang. phosphate buffered saline* – PBS).

Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i analiza poziomu transkryptu *HSD17 β 1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RQ-PCR)

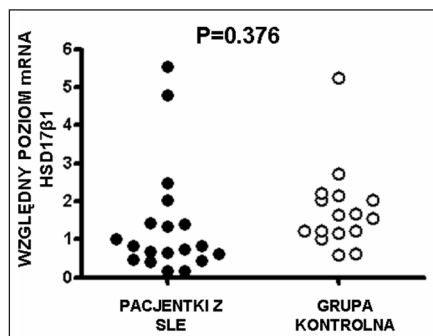
Izolacja całkowitego RNA z komórek

PBMC, zawieszonych w odczynniku TRI Reagent® Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), przebiegała z wykorzystaniem techniki Chomczyńskiego i Sacchi (1987) [3]. Następnie, 1 µg RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji, z wykorzystaniem M-MLV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA), w celu uzyskania cDNA. Pomiar cDNA pacjentów i grupy kontrolnej przeprowadzono z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RQ-PCR). Do reakcji RQ-PCR użyto Light Cycler 480; Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Niemcy) z wykorzystaniem mieszaniny reakcyjnej IQ™ SYBR® Green Supermix Bio-Rad (Hercules, CA). Do amplifikacji wybranego fragmentu cDNA użyto starterów komplementarnych do fragmentu genu *HSD17β1*. Ilość cząsteczek cDNA genu *HSD17β1* odniesiono do ilości cząsteczek cDNA genu referencyjnego deaminazy porfobilinogenu (*ang. porphobilinogen deaminase – PBGD*). Amplifikację cDNA genów *HSD17β1* i *PBGD* przeprowadzono wykorzystując sekwencje starterów zamieszczone w Tabeli II. Do amplifikacji genu *HSD17β1* użyto 1µl cDNA oraz starterów w stężeniu 10µM. W celu amplifikacji genu *PBGD* użyto startery w stężeniu 5µM oraz 1µl cDNA.

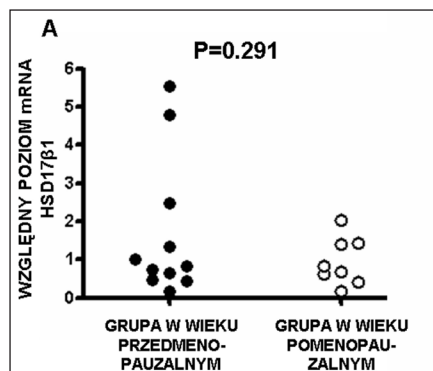
Analiza statystyczna

Do obliczeń statystycznych użyto programu GraphPadPrism 4.

Wartości zmiennych między grupą



Rycina 1
Względny poziom transkryptu genu *HSD17β1* w komórkach PBMC kobiet chorych na SLE i kobiet zdrowych.
HSD17β1 transcript level in PBMC cells in women with SLE and healthy controls.



Rycina 2
Względny poziom transkryptu genu *HSD17β1* w komórkach PBMC (A) kobiet chorych na SLE będących w wieku przed- i pomenopauzalnym, (B) kobiet chorych na SLE – zróżnicowanie ze względu na stadium przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii toczniowej, (C) kobiet chorych na SLE – zróżnicowanie ze względu na punktację skali SLEDAI.
Relative level of *HSD17β1* transcript level in PBMC: (A) in pre- and postmenopausal women with SLE, (B) different stadium of chronic kidney disease in the course of lupus nephritis in women with SLE, (C) different SLEDAI score in women with SLE.

badaną i kontrolną porównano stosując dwustronny, niesparowany test t-studenta, po uprzedniej weryfikacji normalności rozkładu zmiennych.

Wyniki

W naszych badaniach nie wykazaliśmy istotnie statystycznych różnic ($p = 0,376$) we względnym poziomie transkryptów genu *HSD17β1* między grupą kobiet chorych na SLE i kobiet z grupy kontrolnej [Ryc. 1]. Również analiza względnego poziomu transkryptu *HSD17β1* u kobiet chorych na SLE w wieku przed- i pomenopauzalnym nie wykazała istotnych statystycznie różnic ($p = 0,291$) [Ryc. 2(A)]. Porównanie względnego poziomu transkryptu *HSD17β1* między grupami kobiet w zaawansowanym stadium przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii toczniowej (5D – wymagana hemodializa) i kobiet o łagodniejszym przebiegu tej choroby oraz między grupami o poziomie punktów SLEDAI wyższym niż 8 z grupą z niższą punktacją także nie wykazały istotnych statystycznie różnic (odpowiednio $p = 0.582$; $p = 0.329$) [Ryc. 2 (B), (C)].

Dyskusja

Etiologia SLE nie jest w pełni znana, na rozwój choroby wpływa wiele różnych czynników, wśród których wymienia się estrogeny. W syntezę E2, najaktywniejszego biologicznie estrogeny, zaangażowany jest enzym *HSD17β1*. E2 produkowany jest głównie w jajnikach, choć może być syntetyzowany również w innych tkankach, gdzie działa głównie na poziomie lokalnym [17]. E2 wpływa między innymi na układ immunologiczny, wzmacniając jego reakcję [15]. E2 działa poprzez ER, których obecność wykazano w limfocytach [12]. W limfocytach wykazano także obecność transkryptów

genu *HSD17β1* [22]. Nie ma doniesień dotyczących występowania w limfocytach białka tego genu, niemniej obecność transkryptu sugeruje możliwość produkcji E2 przez komórki układu immunologicznego.

Wyniki naszych analiz nie wykazują istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie transkryptu genu *HSD17β1* w komórkach PBMC między grupą pacjentek z SLE a grupą kontrolną. Może to świadczyć o tym, że gonadalna produkcja estrogenów pozostaje najważniejszą drogą oddziaływania E2 na układ immunologiczny, a lokalna synteza E2, o ile następuje, może być na zbyt niskim poziomie, by wpływać na rozwój SLE lub w ogóle nie być zaangażowana w rozwój choroby.

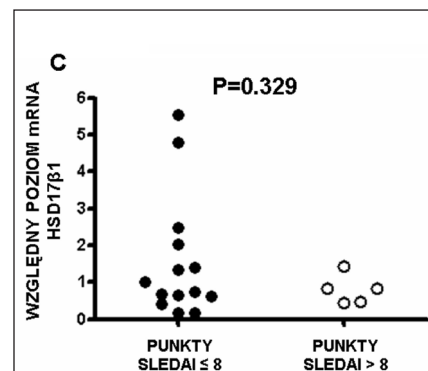
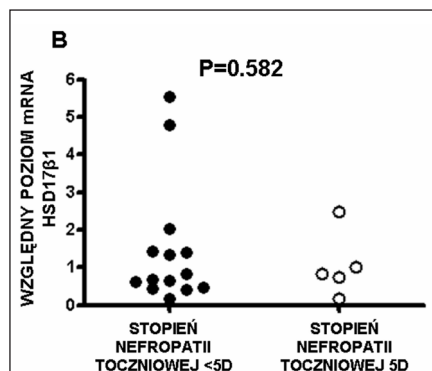
W przypadku porównania poziomu transkryptów genu *HSD17β1* między grupą kobiet chorych na SLE będących przed menopauzą z grupą kobiet będących po menopauzie również nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic. Menopauza powoduje spadek gonadalnej produkcji estrogenów. Wiąże się również ze złagodzeniem objawów SLE, co wiąże wpływ E2 z patogenezą choroby. Brak różnic w poziomie mRNA *HSD17β1* w PBMC między kobietami będącymi przed i po menopauzie sugeruje, że ewentualna lokalna produkcja E2 jest na zbyt niskim poziomie, by wpływać na rozwój SLE.

Istotności statystycznej nie wykazaliśmy także w przypadku porównania względnego poziomu transkryptu *HSD17β1* między grupami kobiet będących w stopniu 5D przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii toczniowej i kobietami z mniejszym upośledzeniem funkcji nerek oraz przy porównaniu poziomu mRNA *HSD17β1* między pacjentkami o punktacji SLEDAI do 8 włącznie i powyżej 8. Wynika z tego, że

Tabela II

Sekwencje starterowe dla genów *HSD17β1* i *PBGD* użyte w RQ-PCR.
Primer sequences for *HSD17β1* and *PBGD* genes used in RQ-PCR.

| GEN | SEKWENCJA STARTEROWA | WIELKOŚĆ PRODUKTU (PZ) |
|----------------|--|------------------------|
| <i>HSD17β1</i> | F: 5' TGA GGA GGT GGC GGA GGT CTT C 3' R: 5' CGC TCG GTG GTG AAG TAG 3' | 75 |
| <i>PBGD</i> | F: 5' GCC AAG GAC CAG GAC ATC 3' R: 5' TCA GGT ACA GTT GCC CAT C 3' | 160 |



poziom transkryptu HSD17 β 1 w komórkach PBMC nie ma powiązania z SLE. Jednak, poziom mRNA nie zawsze jest skorelowany z ilością białka. Możliwe, że na poziomie białka korelacja SLE z ekspresją HSD17 β 1 będzie zauważalna.

Co więcej, na uzyskany wynik może wpływać również rodzaj użytego do badań materiału. W skład PBMC wchodzi m.in. limfocyty, monocyty, czy makrofagi. Możliwe, że zmiany w poziomie transkryptu będą widoczne jedynie w populacji limfocytów CD4+, które są mocniej zaangażowane w tworzenie reakcji autoimmunologicznej niż inne komórki z grupy PBMC.

SLE charakteryzuje się bardzo zróżnicowanym przebiegiem, w którym naprzemiennie występują zaostrzenia i łagodniejsze okresy choroby. Krew pacjentów do badań pobierana była w łagodniejszej fazie SLE, kiedy objawy nie są nasilone. Możliwy brak istotnie statystycznych różnic w poziomie transkryptów HSD17 β 1 może wynikać właśnie z poprawy zdrowia pacjentek. Przypuszczamy, że w czasie kolejnego zaostrzenia SLE poziom HSD17 β 1 wykazywałby większe zróżnicowanie w obu populacjach.

Powiązanie względnego poziomu transkryptów HSD17 β 1 w PBMC z rozwojem SLE wydaje się nie mieć związku. Celem uzyskania pełnego obrazu wymagana jest jednak większa liczba badań. Naszym kolejnym celem jest poszerzenie grupy badanych kobiet, zbadanie obecności białka HSD17 β 1 w PBMC oraz w populacji limfocytów T CD4+. Należałoby również objąć badaniami inne geny związane z metabolizmem E2,

jak HSD17 β 2, którego produkt odpowiada za przekształcenie E2 w E1, oraz sulfatazę steroidową (STS) i sulfatazę estrogenową (EST) zaangażowane w metabolizm E1.

Piśmiennictwo

1. Al-Mogairen S.M., Al-Arfaj A.S., Meo S.A. et al.: Induction of autoimmunity in Brown Norway rats by oral and parenteral administration of sodium silicate. *Lupus* 2009, 18, 413.
2. Bijl M., Limburg P.C., Kahlenberg C.G.M.: New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. *Neth. J. Med.* 2001, 59, 66.
3. Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156.
4. Doria A., Vesco P., Zulian F. et al.: The 1982 ARA/ACR criteria for the classification of systemic lupus erythematosus in pediatric and adult patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994, 12, 689.
5. Finckh A., Cooper G.S., Chibnik L.B. et al.: Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 3648.
6. Klonowska-Szymczyk A., Robak E.: Współczesne poglądy na etiopatogenezę układowego tocznia rumieniowatego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2011, 65, 683.
7. Lau C.S., Yin G., Mok M.Y.: Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* 2006, 15, 715.
8. Li J., McMurray R.W.: Effects of chronic exposure to DDT and TCDD on disease activity in murine systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009, 18, 941.
9. Lichtman E.I., Helfgott S.M., Krieger M.A.: Emerging therapies for systemic lupus erythematosus — Focus on targeting interferon-alpha. *Clin. Immunol.* 2012, 143, 210.
10. Lu Q., Wu A., Richardson B.C.: Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs. *J. Immunol.* 2005, 174, 6212.
11. Lu Q., Wu A., Tesmer L. et al.: Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J. Immunol.* 2007, 179, 6352.
12. Moulton V.R., Holcomb D.R., Zajdel M.C. et al.: Estrogen upregulates cyclic AMP response element modulator α expression and downregulates interleukin-2 production by human T lymphocytes. *Mol. Med.* 2012, 18, 370.
13. Munoz L.E., Gaipal U.S., Franz S. et al.: SLE-a disease of clearance deficiency? *Rheumatology* 2005, 44, 1101.
14. Rahman A., Isenberg D.A.: Systemic lupus erythematosus: mechanism of disease. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 929.
15. Rider V., Abdou N.I.: Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *Int. Immunopharmacol.* 2001, 1, 1009.
16. Riemekasten G., Hahn B.H.: Key autoantigens in SLE. *Rheumatology* 2005, 44, 975.
17. Simpson E.R.: Sources of estrogen and their importance. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 2003, 86, 225.
18. Sullivan K.E.: Genetics of systemic lupus erythematosus: clinical implications; *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 2000, 26, 229.
19. Tsokos G.C., Liossis S.N.: Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol. Today* 1999, 20, 119.
20. Wang J., Nuite M., McAlindon T.E.: Association of estrogen and aromatase gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010, 19, 734.
21. Zhou Z., Shackleton C.H.L., Pahwa S. et al.: Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998, 138, 61.
22. Zhou Z., Speiser P.W.: Regulation of HSD17 β 1 and SRD5A1 in lymphocytes. *Mol. Genet. Metab.* 1999, 68, 410.