

УДК 616.594.14-07:577.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА ПРИ НЕРУБЦОВЫХ ФОРМАХ АЛОПЕЦИИ

Канд. мед. наук Ф. В. АЗИМОВА

*Республиканский специализированный научно-практический центр дерматологии и венерологии
МЗ РУз, Ташкент, Республика Узбекистан*

Проведен анализ распределения полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF у пациентов с нерубцовыми формами алопеции. Наблюдаемые распределения гетерозиготных генотипов обоих локусов достоверно соответствовали ожидаемым по закону о равновесии Харди – Вайнберга. Отмечена низкая прогностическая ценность исследуемых локусов.

Ключевые слова: алопеция, генетика, факторы роста.

В современной дерматокосметологии наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости кожи волосистой части головы, в частности выпадению волос — нерубцовых форм алопеции [1, 2]. Проведенные в последние годы исследования молекулярной биологии в области трихологии позволяют лучше понять регуляцию клеточного цикла волосяного фолликула. В настоящее время огромное внимание уделяется цитокинам, среди которых важное место занимают факторы роста (TGF- β , PDGF, FGF, VEGF, IGF-I, IGF-II). Было установлено, что многие из них не только активируют митоз клеток волосяного сосочка, но и определяют пролиферацию, дифференцировку, клеточную адгезию, миграцию, апоптоз и хемотаксис, регулируя тем самым продолжительность фазы роста волоса [3–5].

К настоящему времени выявлен ряд генов и хромосом, ассоциированных с предрасположенностью к болезням кожи волосистой части головы. Среди них особый интерес представляет изучение гена фактора VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), который локализован в коротком плече 6-й хромосомы. VEGF — один из членов семейства структурно близких белков, которые являются лигандами для семейства его рецепторов. VEGF влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и дифференцировку незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1

VEGF и рецептором-2 VEGF) и активируя их. Эти рецепторы экспрессируются клетками эндотелия стенки кровеносных сосудов. Связывание VEGF с данными рецепторами запускает сигнальный каскад, который в конечном итоге стимулирует рост эндотелиальных клеток сосуда, их дифференцировку и пролиферацию. Эндотелиальные клетки участвуют в таких разнообразных процессах, как вазоконстрикция и вазодилатация, презентация антигенов, а также являются очень важными элементами всех кровеносных сосудов — как капилляров, так и вен или артерий. Таким образом, стимулируя эндотелиальные клетки, VEGF играет центральную роль в процессе ангиогенеза, а в последующем — в митозе и дифференциации клеток [6–9].

Анализ мировой литературы показывает, что полиморфизмы в позициях G-634C и G-1154A гена VEGF повышают активность его промотора. При этом соответствующие С- и А-аллели связаны с повышенной экспрессией VEGF [10–13].

Цель исследования — провести анализ распределения полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF среди больных нерубцовыми формами алопеции.

Под нашим наблюдением находилось 105 больных с различными формами нерубцовых алопеций в возрасте от 14 до 50 лет. Среди них было 38 (36,2%) больных с гнездовой алопецией, 56 (53,3%) с андрогенной, 11 (10,5%) с диффузной. У 15,7% пациентов с гнездовой алопецией реги-

стрировалась ограниченная форма заболевания в прогрессирующей стадии (очаговая, полиочаговая, лентовидная), у 84,3% — распространенная (субтотальная, тотальная, универсальная). Длительность заболевания варьировала от 1 года до 5 лет у 18,6% больных, от 5 до 10 лет — у 37,8%, более 10 лет — у 56,4%. Сопутствующая патология больных была представлена заболеваниями желудочно-кишечного тракта — 27,8% случаев, железодефицитной анемией — 74,3%, нейроциркуляторной дистонией — 16,5%, диффузным зобом с эутиреозом — 69,4%. У 38,6% пациентов наблюдалось поражение ногтевых пластинок кистей: дистрофические изменения, мелкоочечные вдавливания по типу «наперстка», выраженная продольная исчерченность в сочетании с тусклым цветом самих пластин. Клиническая картина локальной (очаговой) формы характеризовалась наличием изолированных, округлой формы очагов выпавших волос. Лентовидная форма (офиязис Цельса) очага поражения локализовалась в области затылка и распространялась до височной области в виде ленты. Переход очага поражения на гладкую кожу — прогностически неблагоприятный признак течения заболевания. Субтотальная форма характеризовалась обширными очагами поражения, образовавшимися в результате слияния более мелких очагов. При тотальной форме наблюдалось отсутствие волос на всей поверхности головы, включая ресницы, брови, а у мужчин — бороду. При универсальной алопеции волосы отсутствовали на всей поверхности кожи пациента.

Среди пациентов с андрогенным выпадением волос мужчин было 35 (61,4%), женщин — 22 (38,6%). Андрогенная алопеция III–V степени по Гамильтону отмечалась в 42,1% случаев, III–IV степени — в 36,8%, V–VI степени — в 21,1%. У большинства (83,7%) женщин наблюдалась алопеция II–III степени по Людвигу и в 16,3% случаев установлена I степень заболевания в прогрессирующей стадии. Длительность заболевания варьировала от 1 года до 5 лет (34,2% больных) и 5–9 лет (65,8% пациентов). У обследованных с андрогенным выпадением волос гормональный статус (лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны, дегидроэпиандростерон, секс-стероидсвязывающий глобулин у женщин, тестостерон у мужчин) был в пределах нормы. У 4 женщин компьютерная томография надпочечников показала гиперплазию коры надпочечников, у них был повышен уровень кортизола до 840 нмоль/л. Диагностирована сопутствующая патология: железодефицитная анемия — у 43,9% больных, зоб различной степени с гипо- и гипертиреозом — у 16,2%. У 11 пациенток наблюдалось диффузное телогеновое выпадение волос, характеризующееся изрежением волос по всей поверхности волосистой части головы.

Молекулярно-генетические исследования проводились у 47 больных (основная группа) на базе лаборатории медицинской генетики НИИ

гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан. Контрольная группа была представлена выборкой из 30 условно здоровых лиц, проживающих в г. Ташкенте. Для элиминации влияния факторов, заведомо изменяющих вероятность развития заболевания, при формировании контрольных групп использовался метод направленного подбора с учетом возраста и пола.

Для молекулярно-генетических исследований полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF нами была сконструирована тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, с использованием двух флуоресцентных зондоводных пробирок. При проведении ПЦР применялись специально подобранные праймеры (табл. 1).

С помощью точного теста Фишера было проверено распределение исследованных полиморфных локусов на соответствие равновесию Харди — Вайнберга. Как видно из табл. 2, наблюдаемые распределения гетерозиготных генотипов (D) обоих локусов соответствовали ожидаемым по закону равновесия Харди — Вайнберга ($p > 0,05$).

В табл. 2 и 3 представлены результаты анализа распределения аллелей и генотипов полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF в основной и контрольной группах. Данные полиморфизмы не часто выявлялись как в группе больных, так и контроля. В основной группе частота мутантных аллелей полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF составила 8,8% и 6,0% соответственно. В контрольной группе аналогичные показатели были равны всего лишь 1,7%. При этом необходимо отметить, что в обеих группах не были обнаружены гомозиготные генотипы данных полиморфизмов.

Различия во встречаемости мутантного аллеля полиморфизма G-634C гена VEGF в обследованных группах были ближе к статистически достоверным результатам ($\chi^2 = 2,7$; $p = 0,09$; OR = 5,7; 95% CI 0,5699; 57,2) в пользу больных алопецией.

У 11,8% пациентов была выявлена аллель A, несущая гетерозиготный генотип мутации VEGF в позиции G-1154A. В контрольной группе лица, несущие мутантную аллель A, составили 3,3%. Предварительно согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов вероятность развития нарушений ангиогенеза у пациентов с алопецией была более чем в 3,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (OR = 3,9; 95% CI 0,3238; 46,17) с уровнем $\chi^2 = 1,2$ и $p = 0,2$.

Однако, несмотря на высокие показатели OR = 5,7 и OR = 3,9 полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF, полученные результаты оказались статистически незначимыми, что, вероятно, связано с малочисленностью исследованных групп.

С целью определения эффективности данных генетических маркеров были рассчитаны чувствительность (SE), специфичность (SP) и показатель

Таблица 1

**Список олигонуклеотидных праймеров для проведения ПЦР
(на основе последовательности гена, представленной в GenBank)**

Ген, локализация	Полиморфизм	Структура использованных олигопраймеров
VEGF 6p21.3	G-634C	F5'-ATTTATTTTTGCTTGCCATT3' R5'-GTCTGTCTGTCTGTCCGTCA3'
	1154G/A	F5'-CGGGCCAGGCTTCACT-3' R5'-CGCTACCAGCCGACTTTTAA-3'

Таблица 2

**Различие между ожидаемой и наблюдаемой частотами
гетерозиготности полиморфизма G-634C гена VEGF**

Группа	Наблюдаемая гетерозиготность	Ожидаемая гетерозиготность	D*
Основная	0,18	0,16	-0,1
Контрольная	0,33	0,33	0,0

Примечание. D* – относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой, рассчитывалось по формуле: $D = (h_{obs} - h_{exp})/h_{exp}$, где h_{obs} и h_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно. То же в табл. 3.

$$D = (0,16 - 0,18)/0,18 = -0,1 \text{ – для основной группы;}$$

$$D = (0,33 - 0,33)/0,33 = 0,0 \text{ – для контрольной группы.}$$

Таблица 3

**Различие между ожидаемой и наблюдаемой частотами
гетерозиготности полиморфизма G-1154A гена VEGF**

Группа	Наблюдаемая гетерозиготность	Ожидаемая гетерозиготность	D*
Основная	0,12	0,11	-0,08
Контрольная	0,33	0,33	0,0

Примечание. $D = (0,11 - 0,12)/0,12 = -0,08$ – для основной группы;

$$D = (0,33 - 0,33)/0,33 = 0,0 \text{ – для контрольной группы.}$$

Таблица 4

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма G-634C гена VEGF

Группа	n	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		G		*C		G/G		**G/C		C/C	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Основная	47	31	91,2	3	8,8	14	82,2	3	17,6	0	0,0
Контрольная	30	59	98,3	1	1,7	29	96,7	1	3,3	0	0,0

Примечание. $*\chi^2 = 2,7$; $p = 0,09$; OR = 5,7; 95% CI 0,5699; 57,2;

$$**\chi^2 = 2,8$$
; $p = 0,09$; OR=6,2; 95% CI 0,5919; 65,24.

Таблица 5

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма G-1154A гена VEGF

Группа	n	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		G		A*		G/G		**G/A		A/A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Основная	47	32	94,0	2	6,0	15	88,2	2	11,8	0	0,0
Контрольная	30	59	98,3	1	1,7	29	96,7	1	3,3	0	0,0

Примечание. $*\chi^2 = 1,2$; $p = 0,3$; OR = 3,7; 95% CI 0,3219; 42,25;

$$**\chi^2 = 1,2$$
; $p = 0,2$; OR = 3,9; 95% CI 0,3238; 46,17.

Таблица 6

Показатели прогностической ценности

Генетический маркер	SE	SP	AUC	OR (95%CI)	*p
G-634C	0,18	0,97	0,57	6,2 (0,591–65,24)	0,08
G-1154A	0,12	0,97	0,54	3,9 (0,32–46,17)	0,09

вероятности отличия больного от здорового полиморфизма G-634C и G-1154A гена VEGF AUC (area under curve) (табл. 6). Прогностическая ценность определялась следующим образом: если показатель AUC < 0,5, то маркер – случайный классификатор, 0,5 < AUC < 0,6 – плохой, 0,6 < AUC < 0,7 – средний, 0,7 < AUC < 0,8 – хороший, AUC > 0,8 – отличный.

В связи с тем что частота полиморфизма G-634C и G-1154A гена VEGF невысокая, их прогностическая ценность также оказалась низкой.

Из-за высокого уровня специфичности показателя SP = 0,97 полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF и очень низкого уровня чувствительности показателей SE = 0,18 и 0,12 соответственно (сильное отклонение в сторону специфичности) нельзя говорить о прогностической ценности обоих маркеров относительно риска развития нерубцовых форм алопеций в нашей популяции.

Таким образом, модифицирован и апробирован метод тестирования полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF на основе ПЦР в реальном времени, не уступающий зарубежным аналогам. Данный метод позволяет эффективно решать

и другие фундаментальные и прикладные задачи современной медицины. Наблюдаемые распределения гетерозиготных генотипов обоих локусов достоверно соответствовали ожидаемым по закону о равновесии Харди – Вайнберга. В связи с тем что частота гетерозиготности полиморфизмов G-634C и G-1154A гена VEGF не высока, их прогностическая ценность оказалась низкой (AUC = 0,57 и 0,54 соответственно), и это требует проведения дальнейших исследований в более широком диапазоне популяции.

Список литературы

1. Адашкевич В. П. Алопеция / В. П. Адашкевич, О. Д. Мядлец, И. В. Тихоновская. – М.: Мед. книга; Н. Новгород: НГМА, 2000. – 187 с.
2. Гаджигороева А. Г. Болезни волос: классификация. Нерубцовые алопеции / А. Г. Гаджигороева // Дерматология. – 2008. – № 1. – С. 66–69.
3. Ахмеров Р. Р. Магнитно-резонансные характеристики тканей при острых одонтогенных воспалительных заболеваниях / Р. Р. Ахмеров, Н. В. Каширин // Тез. докл. 3-й науч.-практ. конф. молодых ученых КГМУ. – Казань, 1998. – С. 13.
4. Зарудий Р. Ф. Применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы для лечения фотодерматоза [Электронный ресурс] / Р. Ф. Зарудий, Р. Р. Ахмеров // Регенеративная хирургия. – 2005. – № 3. – Режим доступа: http://www.reg-surgery.ru/2_2005/articles_ru/007.html
5. Olszewska M. Эффективное лечение андрогенной алопеции у женщин при помощи дутастеридов / M. Olszewska, L. Rudnicka // Лекарственные средства в дерматологии. – 2005. – № 4. – С. 637–640.
6. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells / A. Winiarska [et al.] // Skin pharmacology and physiology. – 2006. – № 19 (6). – P. 311–321.
7. VEGF-receptor signal transduction / M. J. Cross

- [et al.] // Trends in Biochemical Sciences. – 2003. – № 28. – P. 488–494.
8. Wnt11 controls cell contact persistence by local accumulation of Frizzled 7 at the plasma membrane / S. Witzel [et al.] // J. of Cell Biology. – 2006. – № 175 (5). – P. 791–802.
9. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben [et al.] // Pharmacology Review. – 2004. – № 56. – P. 549–580.
10. The antimycotic ciclopiroxolamine induces HIF-1a stability, VEGF expression, and angiogenesis / T. Linden, M. Dorthе, M. Katschinski [et al.] // FASEB J. – 2003. – № 17. – P. 761–763.
11. Colombe L. Prostanoid receptors in anagen human hair follicles / L. Colombe, J. F. Michelet, B. A. Bernard // Experimental Dermatology. – 2008. – № 17 (1). – P. 63–72.
12. Happle R. Diphencyprone for the Treatment of Alopecia Areata-More Data and New Aspects / R. Happle // Arch. of Dermatology. – 2002. – № 138. – P. 112–113.
13. Expression of vascular endothelial growth factor, apoptosis inhibitors (survivin and p16) and CCL27 in alopecia areata before and after diphencyprone treatment: an immunohistochemical study / O. Simonetti [et al.] // British J. of Dermatology. – 2004. – № 150 (5). – P. 940–948.

www.imj.kh.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАКТОРІВ РОСТУ ПРИ НЕРУБЦЕВИХ ФОРМАХ АЛОПЕЦІЇ

Ф. В. АЗИМОВА

Проведено аналіз розподілу поліморфізмів G-634C і G-1154A гену VEGF у пацієнтів із нерубцевими формами алопеції. Розподіли гетерозиготних генотипів обох локусів, що спостерігалися,

достовірно відповідали очікуваним за законом про рівновагу Харді – Вайнберга. Відзначено низьку прогностичну цінність досліджуваних локусів.

Ключові слова: алопеція, генетика, фактори росту.

**MOLECULAR-GENETIC INVESTIGATION OF FACTORS OF GROWTH
AT NONSCARRING ALOPECIA**

F. V. AZIMOVA

The distribution of polymorphisms of G-634C and G-1154A of gene VEGF was analyzed in patients with nonscarring alopecia. The observed distributions of heterozygotic genotypes of both loci significantly corresponded to those expected by Hardy – Weinberg law on balance. Low prognostic value of the investigated loci was noted.

Key words: alopecia, genetics, growth factors.

Поступила 15.10.2014