

Полиморфизм гена — липокалин-2 при акне

С. А. Масюкова¹, В. В. Ашапкин², Л. И. Кутуева², Э. Г. Санакоева³, И. В. Ильина¹, Кахишвили Н.Н.¹

¹Кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии (зав. — проф. В.В. Гладько) Московского института усовершенствования врачей ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств; ²НИИ физико-химической биологии (дир. — проф. В.П. Скулачев) им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Государственный институт (и.о. нач. — О.М. Костюченко) усовершенствования врачей Минобороны России, Москва

Представлены материалы молекулярно-генетического изучения полиморфизма генов, участвующих в реализации терапевтического действия изотретиноина при лечении акне. Показано, что одним из наиболее выраженных ранних эффектов препарата является многократная индукция экспрессии гена липокалин-2 (LCN-2). Обсуждается его роль в качестве одного из генетических маркеров, принимающего участие в формировании наследственной устойчивости к изотретиноину при акне.

Ключевые слова: акне, лечение, изотретиноин, липокалин-2

LIPOCALIN-2 GENE POLYMORPHISM IN ACNE

S.A.Masyukova, V.V.Ashapkin, L.I.Kutueva, E.G.Sanakoeva, I.V.Ilyina, N.N.Kakhishvili

Molecular genetic studies of polymorphisms of genes involved in realization of the therapeutic effect of isotretinoin in acne showed that repeated induction of lipocalin-2 (LCN-2) gene expression is one of the most manifest early effects of the drug. The role of this gene as one of the genetic markers involved in the formation of hereditary resistance to isotretinoin in acne is discussed.

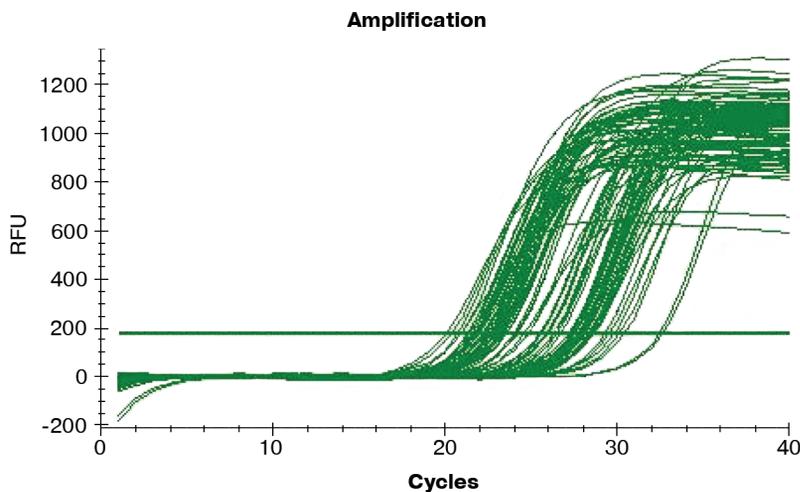
Key words: acne, therapy, isotretinoin, lipocalin-2

Известно, что одним из наиболее ранних лечебных эффектов изотретиноина на клетки сальных желез являются остановка клеточных циклов и апоптоз. В результате происходит уменьшение размера сальных желез и снижение продукции кожного сала уже через 1 нед после приема препарата, достигающие максимума через 8—16 нед. По-видимому, именно этим действием изотретиноина объясняется его быстрый и мощный терапевтический эффект в отношении акне. Терапевтический эффект у большинства пациентов сохраняется очень долго, хотя нормальная морфология сальных желез восстанавливается уже через 2 мес после окончания терапии изотретиноином. В биоптатах кожи, полученных от больных акне, изотретиноин вызывает изменения в активности очень многих генов. Через 1 нед после начала приема препарата происходит активация генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла, индукции апоптоза, защитных реакциях врожденного иммунитета против патогенов бактериальной природы и др. [1]. На более поздних этапах лечения (через 8 нед) наблюдают ингибирование генов, продукты которых участвуют в синтезе стероидных гормонов и липидов, и активацию генов, продукты которых существенны для репаративных процессов в коже [2]. Одним из наиболее выраженных ранних эффектов изотретиноина является многократная индукция экспрессии гена липокалина-2 (LCN-2) — белка из семейства низкомолекуляр-

ных полипептидов — липокалинов, функция которых связана с иммунным ответом, процессами клеточного роста, апоптоза и др. В частности, LCN-2 также известен как нейтрофил желатиназа ассоциированный липокалин (NGAL), участвует в защитных реакциях против бактериальных патогенов. Предполагается, что он убивает клетки бактерий, отбирая из них ионы железа, необходимые для их жизнедеятельности. Об этом свидетельствует его способность связываться с бактериальными сайдерофорами (молекулы-захватчики ионов железа). Хорошо известно, что катионы железа (Fe^{3+}) необходимы для таких важнейших клеточных функций, как дыхание и синтез ДНК. Между тем из-за своей чрезвычайно низкой растворимости биологически доступные формы железа очень невелики (у человека концентрация свободного Fe^{3+} составляет около $10^{-24}M$). Многие патогенные бактерии отбирают жизненно необходимые катионы железа с помощью сайдерофоров, а способность LCN-2 связываться с ними и тем самым препятствовать процессу захвата железа является частью врожденного защитного механизма против таких бактерий. Именно с этой способностью связано еще одно название липокалина-2 — сайдерокалин. В области сальных желез LCN-2 обнаруживают только после приема изотретиноина, причем по времени и локализации в базальном слое клеток его появление совпадает с характерными признаками индукции процессов апоп-

Сведения об авторах:

Масюкова С.А. — д-р мед. наук, проф. (skin.net@mail.ru); Ашапкин В.В. — ст. науч. сотр. (ashapkin@genebee.msu.ru); Кутуева Л.И. — мл. науч. сотр. (kutueva@genebee.msu.ru); Санакоева Э.Г. — канд. мед. наук (dodot@mail.ru); Ильина И.В. — доцент (skin.net@mail.ru), Кахишвили Н.Н. — доцент.



Динамика амплификации геномной ДНК с помощью аллельспецифических праймеров.

тоза. Более того, в модельной системе с культурой себоцитов кожи доказана причинно-следственная связь между этими явлениями. Экзогенный LCN-2, как и изотретиноин, индуцирует апоптоз этих клеток в условиях культуры, а блокирование экспрессии эндогенного гена LCN-2 с помощью комплементарной малой интерферирующей РНК (siRNA), наоборот, предотвращает индукцию апоптоза изотретиноином. Таким образом, центральная роль LCN-2 в опосредовании ранних эффектов изотретиноина представляется хорошо установленной. Логично предположить, что индивидуальная резистентность к действию изотретиноина у некоторых лиц может быть связана с какими-то структурными особенностями LCN-2, полностью или частично препятствующими индукции апоптоза себоцитов под действием изотретиноина. Если речь идет о врожденной резистентности, эти структурные особенности, очевидно, должны быть закодированы в геноме, в первую очередь в кодирующей последовательности самого гена LCN-2.

Материалы и методы

Мы исследовали четыре точечных полиморфизма гена LCN-2. В норме LCN-2 является небольшим (198 аминокислотных остатков) белком. Один из проанализированных полиморфизмов, rs113469275, связан с заменой нормального стоп-кодона в гене дикого типа на кодон аминокислоты аргинин. В результате образуется удлинённый на 94 лишние аминокислотных остатка по сравнению с нормальным LCN-2 белком. Фенотипические последствия такой замены неизвестны, но вряд ли она может остаться без последствий. Известно, что консервативный для липокалин домен включает большую часть полипептидной цепи LCN-2 (45—190-й аминокислотные остатки). Этот домен образует характерную цилиндрическую структуру из 8 параллельных β -цепей, в центре которой находится карман для связывания специфических лигандов. Удлинение полипептидной цепи LCN-2 в 1,5 раза, скорее всего, нарушает его функциональную активность. Кроме того, мы исследовали три полиморфизма, связанных с аминокислотными заменами в структуре LCN-2: rs11556770 — замена глутамина в 39-м положении полипептидной цепи на гистидин; rs2232627 — замена пролина в 121-м положении на серин; rs79993583 — замена треонина в 124-м положении на метионин. Из этих трех полиморфизмов первый и третий связаны с неконсервативными аминокислотными заменами и, вероятно, серьезно нарушают функцию белка, а второй — с консервативной заменой,

скорее всего, не нарушающей функции белка. Для каждого участка гена LCN-2, содержащих каждый из описанных полиморфизмов, мы синтезировали 3 олигонуклеотидных праймера: универсальный, одинаково хорошо подходящий для полимеразной цепной реакции (ПЦР)-амплификации данного участка в аллелях дикого и мутантного типов, и пару аллель-специфических, один из которых идеально соответствовал нуклеотидной последовательности аллеля дикого типа, а второй — последовательности мутантного аллеля. Эффективность амплификации геномной ДНК, выделенной из клеток крови каждого конкретного пациента или лица контрольной группы, сравнивали с каждым аллельспецифическим праймером с помощью ПЦР с детекцией в режиме реального времени в присутствии флуоресцентного красителя SYBR Green. Дискриминацию аллелей считали достоверной, если разница в пороговых циклах между реакциями составляла не менее 3 циклов. Пример кривых флуоресценции, полученных в одном из таких опытов, представлена на рисунке.

Горизонтальная прямая указывает базовый уровень флуоресценции. Пороговым циклом является тот цикл ПЦР, на котором кривая флуоресценции пересекает базовый уровень. При гомозиготном генотипе дикого типа амплификация ДНК с помощью праймера, соответствующего аллелю дикого типа, существенно эффективнее, чем ее амплификация с помощью праймера, соответствующего мутантному аллелю. Пороговый цикл с этим праймером достигается намного раньше. При гомозиготном генотипе мутантного типа картина обратная. При гетерозиготном генотипе оба праймера одинаково эффективны: соответствующие пороговые циклы практически одинаковы. Таким образом, сравнивая пороговые циклы в реакциях с аллельспецифическими праймерами, можно определить генотип каждого пациента по соответствующему полиморфизму.

Результаты и обсуждение

Всех обследуемых разделили на три группы. В 1-ю группу (контроль; $n = 20$) вошли здоровые лица, не имеющие на момент исследования сколько-нибудь заметных признаков акне (№ К1—20); во 2-ю ($n = 16$) — пациенты с акне разной степени тяжести, успешно лечившиеся изотретиноином (№ Ич21—39); в 3-ю ($n = 14$) — с акне разной степени тяжести, проявившие признаки резистентности к изотретиноину, что требовало повторного курса лечения изотретиноином (№ Иу44—127).

По результатам исследования, представленным в таблице, устойчивые к изотретиноину больные не отличаются от изотретиноинчувствительных пациентов и здоровых лиц по частоте встречаемости мутантных аллелей по трем проанализированным полиморфизмам, связанным с аминокислотными заменами в LCN-2. Для полиморфизма, связанного с заменой остатка глутамина в 39-м положении на гистидин, мутантных аллелей не обнаружили ни у одного из обследуемых. По-видимому, такие аллели в принципе очень редки. В случае полиморфизмов, связанных с заменой пролина в 121-м положении на серин и треонина в 124-м положении на метионин, картина немного иная. Для первого мы обнаружили один мутантный аллель в форме гетерозиготы у одного из пациентов, устойчивых к изотретиноину, и ни одного мутантного аллеля — у обследованных из изотретиноинчувствительной и контрольной групп.

Означает ли это, что данный полиморфизм имеет какое-то отношение к изотретиноинустойчивости, сказать трудно. По-видимому, для сколько-нибудь достоверного заключения на этот счет требуется исследование на больших группах лиц, различающихся по устойчивости чувствительности к изотретиноину. Известно, что в случайной популяции СТ (цитозин—тимин) генотип встречается примерно у 1 человека из 100. Еще более интересная ситуация со вторым из этих двух полиморфизмов. В этом случае мутантный аллель в форме гетерозиготы также выявили у 1 изотретиноинрезистентного больного (причем у того же самого!), однако мутантный аллель, причем в форме гомозиготы, обнаружили также и у 1 лица контрольной группы! Известно, что для этого полиморфизма частота встречаемости в случайной популяции мутантного аллеля в форме гетерозиготы составляет примерно 2 на 100 человек, а мутантные аллели в форме гомозиготы чрезвычайно редки. По-видимому, и в этом случае необходимо исследование более обширных групп обследованных, различающихся по устойчивости чувствительности к изотретиноину. Совсем иную картину наблюдали с полиморфизмом, связанным с удлинением полипептидной цепи LCN-2 на 94 аминокислотных остатка. В этом случае мутантные аллели в форме гетерозиготы обнаружили во всех трех группах, но частота их встречаемости у изотретиноинустойчивых пациентов (66,7%) гораздо выше, чем у изотретиноинчувствительных (23,3%) и здоровых лиц (10%). Следует, правда, оговориться, что у одного из изотретиноинчувствительных больных мутантный аллель выявили в гомозиготной форме. Очевидно, данный вид мутации имеет непосредственное отношение к изотретиноинустойчивости. К сожалению, частота его встречаемости в случайной популяции людей неизвестна.

Таким образом, наличие таких мутантных аллелей у некоторых обследованных других групп можно объяснить по-разному. Во-первых, эти лица могут оказаться в действительности также изотретиноинустойчивыми. Этот вопрос нуждается в специальной проверке. Во-вторых, наличие упомянутого мутантного аллеля скорее всего является не единственной причиной изотретиноинустойчивости, а лишь обстоятельством, резко повышающим вероятность возникновения изотретиноинустойчивого фенотипа. Можно с уверенностью утверждать лишь то, что данный полиморфизм является пока наилучшим кандидатом на роль генетического маркера изотретиноинустойчивости у пациентов с акне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson A.M., Zhao W., Gilliland K.L. et al. // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 118, N 4. — P. 1468—1478.
2. Nelson A.M., Zhao W., Gilliland K.L. et al. // Dermato-Endocrinology. — 2009. — Vol. 1, N 3. — P. 177—187.

Поступила 13.12.11

Полиморфизмы гена липокалин-2 у пациентов с акне, устойчивых к изотретиноину, больных, чувствительных к изотретиноину, и здоровых лиц (контроль)

Обследуемый	rs113469275 T595 <u>C</u> Stop199 <u>Arg</u>	rs11556770 G117 <u>T</u> Gln39 <u>His</u>	rs2232627 C361 <u>T</u> Pro121 <u>Ser</u>	rs79993583 C371 <u>T</u> Thr124 <u>Met</u>
K1	TT	GG	CC	CC
K2	TT	GG	CC	<u>TT</u>
K3	<u>CT</u>	GG	CC	CC
K4	TT	GG	CC	CC
K6	TT	GG	CC	CC
K7	TT	GG	CC	CC
K8	TT	GG	CC	CC
K9	TT	GG	CC	CC
K10	TT	GG	CC	CC
K11	TT	GG	CC	CC
K12	TT	GG	CC	CC
K13	TT	GG	CC	CC
K14	TT	GG	CC	CC
K15	<u>CT</u>	GG	CC	CC
K16	TT	GG	CC	CC
K17	TT	GG	CC	CC
K19	TT	GG	CC	CC
K20	TT	GG	CC	CC
Ич21	TT	GG	CC	CC
Ич22	TT	GG	CC	CC
Ич24	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Ич25	TT	GG	CC	CC
Ич26	TT	GG	CC	CC
Ич27	TT	GG	CC	CC
Ич28	TT	GG	CC	CC
Ич29	TT	GG	CC	CC
Ич30	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Ич31	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Ич32	TT	GG	CC	CC
Ич33	<u>CS</u>	GG	CC	CC
Ич35	TT	GG	CC	CC
Ич36	TT	GG	CC	CC
Ич38	TT	GG	CC	CC
Ич39	TT	GG	CC	CC
Иу37	TT	GG	CC	CC
Иу44	TT	GG	CC	CC
Иу46	TT	GG	CC	CC
Иу60	TT	GG	CC	CC
Иу82	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу83	<u>CT</u>	GG	<u>CT</u>	<u>CT</u>
Иу86	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу99	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу104	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Ру114	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу115	TT	GG	CC	CC
Иу117	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу122	<u>CT</u>	GG	CC	CC
Иу127	<u>CT</u>	GG	CC	CC

Примечание. Обычным шрифтом отмечены нуклеотиды, соответствующие аллелям дикого типа, жирным (подчеркнуты) — нуклеотиды, соответствующие мутантным аллелям. К — контрольная группа здоровых лиц, Ич — больные, чувствительные к изотретиноину, Иу — нечувствительные к изотретиноину.