

ОЦЕНКА РОЛИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ NO-СИНТАЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПСОРИАЗА

Е.А. Климов^{1,2,3}, доктор биологических наук, доцент, А.В. Третьяков¹, Е.С. Гапанович¹, З.Г. Кокаева¹, кандидат биологических наук, А.Г. Соболева⁴, кандидат биологических наук, Л.Р. Сакания⁴, И.М. Корсунская⁴, доктор медицинских наук, профессор, В.В. Соболев^{2,4,5}, кандидат биологических наук

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Российская Федерация, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²ООО «Университетская диагностическая лаборатория», Российская Федерация, 119331, Москва, проспект Вернадского, д. 29, пом. I;

³ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», Российская Федерация, 127422, Москва, ул. Костякова д. 12, стр. 4;

⁴ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук», Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4;

⁵ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Российская Федерация, 105064, Москва, Малый казенный пер., д. 5

E-mail: vlsobolew@gmail.com

Цель исследования: анализ 2 однонуклеотидных замен в генах NOS2 (rs2779249, с.-1290G>T, 5'-область) и NOS3 (rs2070744, с.-813C>T, интрон 1) у больных псориазом.

Материал и методы. В исследование включены 88 больных псориазом, находившихся на лечении в Городской клинической больнице №14 им. В.Г. Короленко. В качестве контроля в работе использовались образцы ДНК, выделенной из цельной крови 365 необследованных жителей Москвы и Московского региона (популяционный контроль). Анализ проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с аллельспецифичными зондами.

Результаты. Были получены значения частот генотипов исследуемых замен. Для исследованных SNV не выявлено ассоциаций с заболеванием: NOS3 (rs2070744) — $\chi^2=0,487$; $p=0,485$ и NOS2 (rs2779249) — $\chi^2=0,859$; $p=0,354$. При этом установлено значительное отклонение частот генотипов замены в гене NOS3 от равновесия Харди–Вайнберга: у больных — $\chi^2=46,32$ ($p=0$), в контрольной группе — $\chi^2=225,86$ ($p=0$).

Заключение. Полученные результаты не выявили значимых ассоциаций исследуемых замен с псориазом. Предполагается, что их влияние будет заметнее в комплексе с другими заменами данных генов или на выборке большего размера. Возможно также, что гиперактивация регуляции экспрессии NO-синтаз при псориазе не зависит от наличия исследованных полиморфных вариантов генов.

Ключевые слова: псориаз, синтазы оксида азота, NOS2, NOS3, полиморфизм ДНК, генетические ассоциации

EVALUATION OF THE ROLE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF NO-SYNTASES GENES OF IN PATHOGENESIS OF PSORIASIS

Е.А. Klimov^{1,2,3}, A.V. Tretiyakov¹, E.S. Gapanovich¹, Z.G. Kokaeva¹, A.G. Soboleva⁴, L.R. Sakaniya⁴, I.M. Korsunskaya⁴, V.V. Sobolev^{2,4,5}

¹Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1–12, Moscow, 119234, Russian Federation;

²University Diagnostic Laboratory, LLC, Vernadskogo av., 29, room 1, Moscow, 119331, Russian Federation;

³Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Kostyakova str., 12–4, Moscow, 127422, Russian Federation;

⁴Centre of Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russian Federation

⁵I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera Malyy Kazennyyby street, 5, Moscow, 105064, Russian Federation

E-mail: vlsobolew@gmail.com

The aim of the study was to analyze two single nucleotide substitutions in the NOS2 (rs2779249, c-1290G>T, 5'-region) and NOS3 (rs2070744, c-813C>T, in tron 1) genes in psoriasis patients.

Materials and methods. DNA samples from 88 psoriasis patients and 365 control samples (population control) were studied. The analysis was carried out by Real-Time PCR with allele-specific probes.

Results. There were obtained frequencies of studied genotypes of the substitutions. No associations between single nucleotide variants (SNVs) and the disease: NOS3 (rs2070744) — $\chi^2=0,487$; $p=0,485$ и NOS2 (rs2779249) — $\chi^2=0,859$; $p=0,354$ were found. In this case a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in the frequencies of the replacement genotypes in the NOS3 gene was revealed in patients [$\chi^2=46,32$ ($p=0$)], in control group — $\chi^2=225,86$ ($p=0$).

Conclusion. The obtained results failed to show significant associations of investigated substitutions with psoriasis. Their influence was assumed to be more noticeable in the conjunction with other replacements of these genes or on a larger sample. Perhaps, just like the hyperactivation, the regulation of the expression of NO synthases in psoriasis, does not depend on the presence of the investigated polymorphic variants of genes.

Key words: psoriasis, nitric oxide synthase, NOS2, NOS3, DNA polymorphism, genetic associations

ВВЕДЕНИЕ

Псориаз является распространенным (2% населения [1]) хроническим воспалительным заболеванием кожи, и, хотя природа этого заболевания не выяснена окончательно, имеются убедительные доказательства того, что генетическая предрасположенность и иммунологические факторы играют

важную роль в его развитии [2]. На возникновение и течение заболевания влияют также инфекции, стрессы и психические травмы [3].

Для псориаза характерны нарушения дифференцировки и пролиферации кератиноцитов, обусловленные аутоиммунной реакцией Т-лимфоцитов и макрофагов против

клеток кожи. ДНК распадающихся кератиноцитов является антигеном, который вызывает воспаление, ангиогенез и пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Дермальные дендритные клетки презентруют антиген Т-хелперам (Th0)-лимфоцитам и стимулируют пролиферацию Т-киллеров и Т-хелперов 1-го типа, секретирующих различные химические сигналы-цитокины: фактор некроза опухоли (TNF)- α , интерлейкин (IL)-1 β , IL6, интерферон (IFN)- γ и IL17, которые вызывают воспаление, а также IL22, вызывающий усиленную пролиферацию кератиноцитов и нарушение их нормального созревания и дифференцировки. Реагируя на эти цитокины, кератиноциты продуцируют IL1, IL6 и TNF α , которые обуславливают хемотаксис новых иммунных клеток в месте воспаления, их повышенную пролиферацию, дальнейшее развитие и усиление воспалительной реакции. Гибнущие в результате апоптоза незрелые кератиноциты высвобождают еще больше ДНК, дополнительно стимулируя дендритные клетки. Считается, что причина развития таких иммунопатологических реакций заключается в дефекте регуляторных Т-клеток-супрессоров и нарушении секреции или работы регуляторного, противовоспалительного цитокина IL10 [4].

Псориаз имеет чрезвычайно сложную генетическую основу. В течение последних 5 лет с помощью полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) было выявлено множество локусов – потенциальных регионов предрасположенности к псориазу [5]. Гены-кандидаты можно условно разделить на группы [6]:

- 1) отвечающие за нарушение барьерной функции кожи;
- 2) участвующие в IL23-сигнальном пути, отвечающем за адаптивный иммунитет;
- 3) принимающие участие в сигнальном пути ядерного фактора NF- κ B и интерферона, синтезе клетками IL17, отвечающие за врожденный иммунитет;
- 4) участвующие в презентации антигена.

Популяционные и семейные исследования также подтверждают наличие генетической предрасположенности к псориазу – риск развития заболевания выше у родственников больных, чем в целом у населения, а также у монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными (соответственно 20–73% против 9–20% в зависимости от изучаемой популяции) [3]. Есть данные о влиянии на патогенез эпигенетических факторов (метилирования ДНК, модификации гистонов и регуляции микроРНК) [7].

Оксид азота (NO) является одним из сильнейших вазодилататоров. Его активный синтез происходит на ранних стадиях раневого ответа, а также при воспалении. Функция NO заключается в локальной вазодилатации при повреждении и воспалении, что способствует привлечению в том числе участвующих в иммунном ответе клеток и инициации воспаления. NO не имеет рецепторов, напрямую взаимодействуя с растворимой гуанилатциклазой гладкомышечной клетки сосуда, приводя к активации сигнального пути вазодилатации. Семейство NO-синтаз включает 3 белка: нейрональная, индуцибельная и эндотелиальная NO-синтазы, соответственно кодируемые генами *NOS1*, *NOS2* и *NOS3*.

При псориазе выявлено увеличение содержания NO в патологически измененных тканях [8, 9]. Это влияет на постоянное поддержание воспалительного процесса в пораженной коже; NO является также

мощным регулятором роста и дифференцировки кератиноцитов, которые вовлечены в патогенез псориаза.

Целью нашей работы был анализ 2 однонуклеотидных замен (SNV) в генах *NOS2* (rs2779249, с.-1290G>T, 5'-область) и *NOS3* (rs2070744, с.-813C>T, интрон 1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с аллельспецифичными зондами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пациенты. Образцы крови больных псориазом были получены в Городской клинической больнице №14 им. В.Г. Короленко. Пациенты с диагнозом псориаза (n=88; основная группа), проживающие в Москве или ближайшем Подмосковье, были отобраны в соответствии с Международной классификацией болезней (L-40). В качестве контроля в работе использовались образцы ДНК, выделенной из цельной крови необследованных жителей Москвы и Московского региона (n=365; популяционный контроль). Взятие крови производили на московской станции переливания крови. Все пациенты, участвующие в исследовании, были ознакомлены с целями работы и подписали информированное согласие. Исследование проводили в соответствии с этическими стандартами, закрепленными в Хельсинкской декларации (1964). Образцы крови были собраны квалифицированным флебологом.

Молекулярно-генетический анализ. ДНК из цельной крови выделяли с помощью набора MagnaTM DNA Prep 200 («Изоген», Россия). Выделение ДНК проводили в соответствии с прописью, представленной изготовителем, с использованием специальных магнитных штативов. Для выделения брали 200 мкл цельной крови.

Флюоресцентные зонды (TaqMap пробы) и праймеры для анализа аллельного состояния исследуемых замен были синтезированы в ООО «ДНК-Синтез» (Москва). При производстве меченых праймеров для TaqMap проб использовались флюоресцирующие красители VIC и FAM и гаситель BHQ1. Нуклеотидные последовательности праймеров описаны в табл. 1.

Для постановки ПЦР в реальном времени использовалась реакционная смесь qPCRmix-HS («Евроген», Россия). В состав смеси входят все необходимые компоненты для проведения реакции: высокопроцессивная Taq ДНК полимеразы, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg+2, ПЦР буфер. Генотипирование проводили в 2-кратной повторности с постановкой отрицательных контрольных образцов. Каждая реакционная смесь содержала по 20 пмоль каждого из 2 (прямой и обратный) праймеров и по 20 пмоль флюоресцентных зондов. ПЦР в реальном времени проводили с использованием прибора CFX-96 (фирма Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

Таблица 1

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ ПАР ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ (T_{отж} – ТЕМПЕРАТУРА ОТЖИГА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ)

Последовательность праймеров и зондов	T _{отж} , °C	Ген (SNV)	Размер продукта (п.н.)
F: ACCAGGGCATCAAGCTCTTC R: GCAGGTCAGCAGAGACTAG C: VIC-AGGGTCAGCCGCCAG-BHQ1 T: FAM-AGGGTCAGCCAGCCAG-BHQ1	55	<i>NOS3</i> (rs2070744)	67
F: GCCTCTCAAAGTGCTAGGATTACAA R: GGGGAATACTGTATTTCAGGCATTATAAGGA T: VIC-TAGCCACAATGCCCG-BHQ1 G: FAM-TAGCCACCATGCCCG-BHQ1	56	<i>NOS2</i> (rs2779249)	88

Таблица 2

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГЕНОВ

NOS2	Основная группа	Контроль	NOS3	Основная группа	Контроль
Аллель Т	0,330	0,294	Аллель Т	0,420	0,450
Аллель G	0,670	0,706	Аллель С	0,580	0,550
Генотип TT	0,091	0,080	Генотип TT	0,000	0,003
Генотип TG	0,477	0,427	Генотип TC	0,841	0,894
Генотип GG	0,432	0,493	Генотип CC	0,159	0,103

Статистическую обработку данных проводили с применением критерия Пирсона (χ^2). Поиск комплексных генотипов, ассоциированных с заболеванием, выполнен с использованием программы анализа полигенных данных APSampler v.3.6.0.1 (<https://sourceforge.net/projects/apsampler/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе молекулярно-генетического анализа были получены значения частот генотипов исследуемых генов. Выявленные частоты аллелей и генотипов представлены в табл. 2.

Для исследованных SNV не выявлено ассоциаций с заболеванием: NOS3 (rs2070744) — $\chi^2=0,487$; $p=0,485$ и NOS2 (rs2779249) — $\chi^2=0,859$; $p=0,354$. При этом нами установлено значительное отклонение частот генотипов замены в гене NOS3 от равновесия Харди–Вайнберга: в основной группе — $\chi^2=46,32$ ($p=0$), в контрольной — $\chi^2=225,86$ ($p=0$).

В ходе поиска комплексных генотипов также не обнаружено ассоциированных с псориазом сочетаний аллелей/генотипов.

Гиперпродукция NO в пораженной коже отмечалась неоднократно [10, 11], также установлена роль NO в пролиферации кератиноцитов [12]. Экспрессия индуцибельной синтазы NO (NOS2) увеличена в пораженной псориазом коже [13, 14].

Была выявлена значимая ассоциация с псориазом аллеля С в гене NOS3 (rs2070744), влияющая на концентрацию NO в плазме [1]. Другими авторами отмечена ассоциация другого полиморфного варианта гена NOS3 с псориазом [15].

Для гена NOS2 (замена rs4795067) показана ассоциация с псориазом в полногеномном ассоциативном исследовании [16].

Аллель Т замены rs2779249 в гене NOS2 приводит к 5-кратному увеличению транскрипционной активности NOS2 по сравнению с аллелем G [17]. Известно, что аллель С замены rs2070744 в гене NOS3 снижает промоторную активность гена NOS3 [18]. Таким образом, к увеличению экспрессии NO-синтаз должно приводить сочетание аллелей Т и С соответственно генов NOS2 и NOS3.

Между тем нами не выявлено значимых ассоциаций исследуемых генов с псориазом. Возможно, их влияние будет заметнее в комплексе с другими заменами данных генов или на выборке большего размера. Также нельзя исключить того, что при псориазе происходят нарушения сигнальных путей в пораженных тканях, что сопровождается гиперактивацией регуляции экспрессии NO-синтаз, не зависящей от наличия исследованных полиморфных вариантов генов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Coto-Segura P., Coto E., Mas-Vidal A., Morales B., Alvarez V., Diaz M., Santos-Juanes J. Influence of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in psoriasis risk. Archives of Dermatological Research. 2011; 303 (6): 445–9. DOI: 10.1007/s00403-011-1129-9.
- Rieder E., Tausk F. Psoriasis, a model of dermatologic psychosomatic disease: Psychiatric implications and treatments. International J. of Dermatology. 2012; 51: 12–26. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2011.05071.x.
- Di Meglio P., Villanova F., Nestle F. O. Psoriasis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2014; 4 (8): 1–30. DOI: 10.1101/cshperspect.a015354.
- Болевич С. Б., Уразалина А. А. Псориаз: современный взгляд на этиопатогенез. Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. 2013; 2 (42): 202–6. (Bolevich S.B., Urazalina A.A. Psoriasis: modern view at aetioopathogenesis. Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii. 2013; 2 (42): 202–6 (In Russian))
- Ryan C., Korman N.J., Gelfand J.M., Lim H.W., Elmets C.A., Feldman S.R., Menter A. Research gaps in psoriasis: Opportunities for future studies. J. of the American Academy of Dermatology. 2014; 70 (1): 146–67. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.08.042.
- Минеева А. А., Кожушная О. С., Волнухин В. А., Фриго Н. В., Знаменская Л. Ф., Кубанов А. А., Мелехина Л. Е. Изучение генетических факторов предрасположенности к развитию псориаза. Вестник дерматологии и венерологии. 2012; 3: 30–8. (Mineeva A.A., Kozhushnaya O.S., Volnuhin V.A., Frigo N.V., Znamenskaya L.F., Kubanov A.A., Melekhina L.E. Study of the genetic factors predisposing to the development of psoriasis. Vestnik dermatologii i venerologii. 2012; 3: 30–8 (In Russian))
- Chandra A., Ray A., Senapati S., Chatterjee R. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. Molecular Immunology. 2015; 64 (2): 313–23. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.12.014.
- Li Y., Zhang G., Xiao R., Chen H., Wen H. Expression of NOS2 and HIF-1 α with angiogenesis in affected skin biopsies from patients with psoriasis. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2010; 35 (9): 952–7. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2010.09.009.
- Sherratt J.A., Weller R., Savill N.J. Modelling blood flow regulation by nitric oxide in psoriatic plaques. Bull Math Biol. 2002; 64 (4): 623–41. DOI: 10.1006/bulm.2001.0271.
- Bruch-Gerharz D., Schnorr O., Suschek C., Beck K.F., Pfeilschifter J., Ruzicka T., Kolb-Bachofen V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. Am. J. Pathol. 2003; 162 (1): 203–11. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63811-4.
- Gokhale N.R., Belgaurkar V.A., Pandit D.P., Deshpande S., Damle D.K. A study of serum nitric oxide levels in psoriasis. Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. 2005; 71 (3): 175–8. DOI: 10.4103/0378-6323.16232.
- Trepicchio W.L., Ozawa M., Walters I.B., Kikuchi T., Gilleaudeau P., Bliss J.L., Schwertschlag U., Dörner A.J., Krueger J.G. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. J. Clin. Invest. 1999; 104 (11): 1527–37. DOI: 10.1172/JCI6910.
- Schwenker A., Billar T.R. Nitric oxide and wound repair. Surg Clin. North Am. 2003; 83 (3): 521–30. DOI: 10.1016/S0039-6109(02)00207-4.
- Simonetti O., Lucarini G., Campanati A., Goteri G., Zizzi A., Marconi B., Ganzetti G., Minardi D., Di Primio R., Offidani A. VEGF, survivin and NOS overexpression in psoriatic skin: critical role of nitric oxide synthases. J. Dermatol Sci. 2009; 54 (3): 205–8. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2008.12.012.
- Senturk N., Kara N., Aydin F., Gunes S., Yuksek E.P., Canturk T., Bagci H., Turanli A.Y. Association of eNOS gene polymorphism (Glu298Asp) with psoriasis. J. Dermatol. Sci. 2006; 44 (1): 52–5. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2006.05.011.
- Stuart P.E., Nair R.P., Ellinghaus E., Ding J., Tejasvi T., Gudjonsson J.E., Li Y., Weidinger S., Eberlein B., Gieger C., Wichmann H.E., Kunz M., Ike R., Krueger G.G., Bowcock A.M., Mrowietz U., Lim H.W., Voorhees J.J., Abecasis G.R., Weichenthal M., Franke A., Rahman P., Gladman D.D., Elder J.T. Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. Nat Genet. 2010; 42 (11): 1000–4. DOI: 10.1038/ng.693.
- Fu L., Zhao Y., Lu J., Shi J., Li C., Liu H., Li Y. Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. J. Hypertens. 2009; 27 (5): 991–1000. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3283294bec.
- Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M., Shimasaki Y., Kugiyama K., Ogawa H., Motomura T., Saito Y., Ogawa Y., Miyamoto Y., Nakao K. T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. Circulation. 1999; 99 (22): 2864–70. DOI: 10.1161/01.CIR.99.22.2864.

Поступила 9 февраля 2018 г.

Для цитирования: Климов Е.А., Третьяков А.В., Гапанович Е.С., Кокаева З.Г., Соболева А.Г., Сакания Л.Р., Корсунская И.М., Соболев В.В. Оценка роли полиморфных вариантов генов NO-синтаз в патогенезе псориаза. Молекулярная медицина. 2018; 16 (3): 62–64. <https://doi.org/10.29296/24999490-2018-04-11>

For citation: Klimov E.A., Tretiakov A.V., Gapanovich E.S., Kokaeva Z.G., Soboleva A.G., Sakaniya L.R., Korsunskaya I.M., Sobolev V.V. Evaluation of the role of polymorphic variants of NO-synthases genes of in pathogenesis of psoriasis. Molekulyarnaya meditsina. 2018; 16 (3): 62–64 (in Russian). <https://doi.org/10.29296/24999490-2018-04-11>