

Экспрессия матриксных металлопротеаз при псориазе и атеросклерозе

М.Е. Саутин¹, А.Г. Соболева¹, А.Д. Золотаренко¹, Э.С. Пирузян¹, И.М. Корсунская^{2,3}, П.Ю. Орехов⁴, А.В. Чупин⁴, С.А. Брускин¹, В.В. Соболев¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва; ²ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва; ³Кафедра кожных и венерических болезней (зав. — проф. О.Ю.Олисова) лечебного ф-та ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; ⁴ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва

Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени проанализированы псориазные и атеросклеротические бляшки. Показано изменение экспрессии генов матриксных металлопротеаз (ММР-2 и ММР-9) как в пораженной псориазом коже, так и в пораженных атеросклерозом сосудах по сравнению с таковыми в неповрежденных образцах. При индивидуальном анализе каждого больного установлено, что уровень экспрессии гена ММР-2 в пораженной псориазом коже у большинства пациентов понижен относительно контроля, а в атеросклеротических бляшках — повышен. Сделан вывод о возможной ключевой роли гена ММР-9 в патогенезе псориаза и атеросклероза.

Ключевые слова: псориаз, атеросклероз, матриксные металлопротеазы, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEASES IN PSORIASIS AND ATHEROSCLEROSIS

M.E.Sautin, A.G.Soboleva, A.D.Zolotarev, E.S.Piruzyan, I.M.Korsunskaya, P.Yu.Orekhov, A.V.Chupin, S.A.Bruskin, V.V.Sobolev

Psoriatic and atherosclerotic plaques were analyzed by the real time polymerase chain reaction. The expression of matrix metalloprotease genes (MMP-2 and MMP-9) was changed in psoriatic skin and in atherosclerotic vessels in comparison with intact specimens. Individual analysis for each patient showed that the level of MMP-2 gene expression in psoriatic skin was lower in comparison with the control in the majority of patients, while its level in atherosclerotic plaques was higher than normally. The probable key role of MMP-9 gene in the pathogenesis of psoriasis and atherosclerosis is hypothesized.

Key words: psoriasis, atherosclerosis, matrix metalloproteases, real time polymerase chain reaction

Матриксные металлопротеазы (ММР) представляют собой семейство из 28 цинксвязывающих протеолитических ферментов. Основная функция ММР — ремоделирование и деградация внеклеточного матрикса и клеточных мембран при различных биологических процессах: формировании скелета, эмбриональном развитии, ангиогенезе, клеточной миграции, ранозаживлении и т. п. [1, 2]. ММР принимают участие в развитии иммунного ответа, активируя синтез антимикробных белков, про- α -дефензинов (криптидины), и репарации поверхности поврежденного эпителия [3]. ММР также регулируют активность воспалительных медиаторов — цитокинов и хемокинов [4]. Так, ММР-9 отрезает N-терминальный домен у зрелого СХС-хемокина (интерлейкин — (IL)-8), в результате чего повышается его хемоаттрактивная активность [5]. ММР играют важную роль в регуляции проницаемости сосудов, разрушая межклеточные связи между

эндотелиальными клетками, способствуя миграции лейкоцитов в очаги воспаления [6], и участвуя в патогенезе злокачественных, сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза, а также артрита, болезни Крона, псориаза [1, 7, 8].

При атеросклерозе ММР играют важную роль, способствуя разрушению внеклеточного матрикса артерий, разрыву атеросклеротических бляшек, что ведет к инфаркту [9]. Нарушение баланса между синтезом и разрушением внеклеточного матрикса, который регулируется совместным действием различных металлопротеаз и их тканевых ингибиторов (ТИМР), приводит к различным сосудистым заболеваниям: преобладающей аневризме аорты, варикозному расширению вен, гипертонии [2, 10, 11]. Активную роль ММР играют и в патогенезе псориаза [12—14], изменения в коже, при котором могут быть связаны с повышенной экспрессией кератиноцитами эпидермиса ММР-2 (гелатиназа А)

Сведения об авторах:

Саутин Максим Евгеньевич — аспирант; Соболева Анна Геннадьевна — канд. биол. наук; Золотаренко Алена Дмитриевна — аспирант; Пирузян Элеонора Суреновна — д-р биол. наук, проф.; Корсунская Ирина Марковна — д-р мед. наук, проф.; Орехов Павел Юрьевич — канд. мед. наук; Чупин Андрей Валерьевич — д-р мед. наук, проф.; Брускин Сергей Александрович — канд. биол. наук; Соболев Владимир Васильевич — канд. биол. наук (sobolew_vl@mail.ru).

Характеристика пациентов с атеросклерозом ($n = 10$) и псориазом ($n = 10$)

Показатель	Атеросклероз	Псориаз
Возраст, годы	$68,7 \pm 11,2$	$37,9 \pm 9,3$
Мужчины	10 (100%)	7 (70%)
Женщины	—	3 (3%)
Индекс PASI	—	$24,6 \pm 5,7$

и клетками дермы — MMP-9 (гелатиназа В). При этом не происходит разрушения базальной мембраны, и не обнаруживаются какие-либо изменения в структуре коллагенов I, III, IV и VII типов. Таким образом, MMP-2 и MMP-9 участвуют в ремоделировании кожных покровов при псориазе [15].

MMP-2 и MMP-9 отличаются от других металлопротеаз наличием трех доменов фибронектина II типа, связывающих денатурированный коллаген, что усиливает взаимодействие этих металлопротеаз с желатином или желатиноподобными субстратами [1].

В данной работе методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проведен сравнительный анализ экспрессии генов *MMP-2* и *MMP-9* в образцах кожи, пораженной псориазом и атеросклеротических бляшках сосудов, относительно таковой в нормальных тканях.

Материалы и методы

Забор биоптатов кожи у 10 больных вульгарным псориазом из пораженного и непораженного (на расстоянии около 3 см от пораженной кожи) участков кожи проводили под местной анестезией с помощью дерматологического пробойника (4 мм). Пациенты не получали какой-либо системной или PUVA/UV-терапии в течение 1 мес до взятия биопсии кожи (см. таблицу).

Для забора атеросклеротических биопсий использовали материал, полученный при оперативном лечении 10 пациентов, страдающих атеросклеротическим повреждением бедренных артерий. В ходе открытой операции иссекали участок поверхностной бедренной артерии, окклюзированный атеросклеротической бляшкой, после чего производили имплантацию протеза бедренной артерии в образовавшийся дефект. В качестве контрольного образца, для исследования производили забор участка притока общей бедренной артерии не подверженный атеросклеротическому процессу. В исследование также включили материал, полученный от пациентов с атеросклеротическим повреждением артерий, питающих щитовидную железу и участки стенки аневризматического мешка аорты. Забор производили у больных, проходивших лечение по различным диагнозам. Образцы быстро замораживали в жидком азоте. Взятые пробы взвешивали и измельчали в ступке, не допуская размораживания образца. РНК из биопсий выделяли на колонках Qiagen по стандартному протоколу RNeasy Mini Kit. Для освобождения препаратов РНК от примесей ДНК проводили обработку ДНазой Qiagen. Электрофорез осуществляли в горизонтальном агарозном геле в буфере TAE (40 мМ Трис-НСl, рН 8; 1 мМ ЭДТА; 20 мМ CH_3COOH). Использовали гели из 2% агарозы. Перед нанесением к каждому образцу добавляли буфер для нанесения (70% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий), 1/6 часть от объема образца.

Обратную транскрипцию проводили следующим образом. В пробирки для ПЦР объемом 200 мкл вносили буфер, dNTP, 100 единиц обратной транскриптазы M-MLV (Promega), 20 единиц ингибитора РНКаз RNasin («Promega»), случайные гексануклеотидные праймеры («Promega») и РНК до конечной концентрации не более 100 нг/мкл. Смесь термостатировали в течение 1 ч при температуре 37°C.

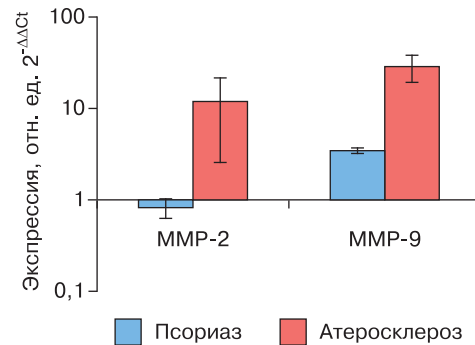


Рис. 1. Содержание мРНК генов *MMP-2*, *MMP-9* в псориазических и атеросклеротических бляшках по сравнению с таковыми в непораженных участках кожи и сосудов. Здесь и на рис. 2, 3: за единицу принят уровень экспрессии в визуально непораженных участках ($p < 0,05$).

Для визуализации продуктов амплификации ПЦР использовали бромистый этидий. Краситель добавляли в гель в процессе его приготовления до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Результаты электрофореза визуализировали в УФ-свете на трансиллюминаторе. В качестве стандарта длины и количества ДНК использовали 7 мкл маркера (1 kb, «Promega»).

Праймеры к мРНК генов *MMP-2* и *MMP-9* подбирали с помощью программ Beacon Designer 7. Праймеры и пробы были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез». Температуру отжига для праймеров подбирали опытным путем, принимая за исходную температуру, рассчитанную с помощью программы OligoCalculator. При отработке условий ПЦР в качестве матрицы использовали геномную ДНК человека и тотальную кДНК человека.

ПЦР-РВ проводили в 48-луночных оптических планках с использованием меченных флюоресцентными агентами олигонуклеотидных проб. Реакцию проводили с использованием 5-кратной реакционной смеси с референсным красителем ROX («Евроген»).

Амплификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (Illumina, «Есо»), используя программу «two step»: 1) денатурация при температуре 95°C в течение 4 мин, 2) денатурация при 94°C в течение 15 с, 3) отжиг при 58°C в течение 15 с, 4) элонгация при 72°C в течение 15 с, 5) этапы 2—4 повторяли 35 раз. Экспрессию генов-мишеней нормализовали на ген домашнего хозяйства *GAPDH*. Амплификацию гена *GAPDH* и изучаемых генов проводили в разных пробирках.

Результаты ПЦР обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$, который показывает, во сколько раз изменяется экспрессия гена в пораженном образце по сравнению с таковым в непораженном. $\Delta\Delta C_t$ рассчитывали как $\Delta C_t = \Delta C_t$ (пораженная кожа) — ΔC_t (непораженная кожа), и каждое значение $\Delta C_t = \Delta C_t$ (исследуемый ген) — $\Delta C_t(\text{GAPDH})$, согласно [16]. Эксперименты проводили в 3-кратном повторении для каждого образца.

Результаты и обсуждение

Для сравнения уровня экспрессии генов *MMP-2* и *MMP-9* в образцах пораженной псориазом кожи и непораженной, а также в сосудах с атеросклеротической бляшкой и чистых использовали все значения экспрессии гена и сравнивали их между собой как две выборки. Для подтверждения статистической значимости различий экспрессии генов *MMP-2* и *MMP-9* в совокупности одной из выборок образцов по сравнению с другой выборкой использовали непараметрический критерий Манна—Уитни (рис. 1).

Результаты проведенного эксперимента показали, что экспрессия гена *MMP-2* в пораженной псориазом коже снижена как относительно экспрессии в непораженной коже (в 1,3 раза), так и относительно экспрессии в атеросклеротических бляшках (в 12 раз).

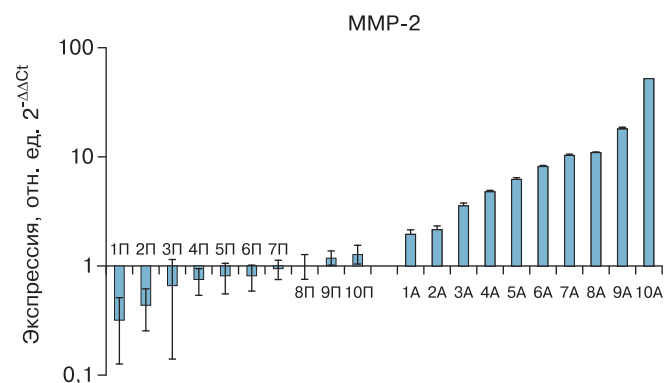


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *MMP-2* в пораженной псориазом коже и атеросклеротических бляшках сосудов у разных больных по сравнению с непораженными участками. П — псориазные образцы, А — атеросклеротические образцы.

Экспрессия гена *MMP-9* была значительно повышена как в псориазных (в 3,5 раза) так и в атеросклеротических (в 28 раз) образцах относительно таковой в непораженных образцах. В целом уровень экспрессии *MMP-2* и *MMP-9* в атеросклеротических образцах намного превосходил уровень экспрессии в псориазных образцах. Уровень экспрессии гена *MMP-2* в пораженной псориазом коже у большинства пациентов был понижен относительно контроля и изменялся от снижения в 3,2 раза до повышения в 1,3 раза (рис. 2). В среднем экспрессия гена *MMP-2* у больных псориазом оказалась пониженной в пораженной коже, относительно аналогичного показателя в визуально непораженной в $1,3 \pm 0,19$ раза. В атеросклеротических бляшках уровень экспрессии гена *MMP-2* относительно контроля у всех пациентов был повышен с большим разбросом. Так, у одного больного (наблюдение 1А) он был повышен в 2 раза, а у другого (наблюдение 10А) — в 53 раза.

Полученный результат свидетельствует о том, что в пораженной псориазом коже не происходит активации экспрессии *MMP-2*. Отсутствие повышения экспрессии гена *MMP-2*, вероятно можно, объяснить тем, что в его промоторной области отсутствует проксимальный сайт связывания AP-1, и лишь в дистальной области промотора есть неканонический сайт связывания димеров FRA-1/JUN-B транскрипционного фактора AP-1 [17]. При этом есть данные о том, что белковый уровень MMP-2 и его TIMP-2 в псориазных бляшках повышен [18].

Уровень экспрессии гена *MMP-9* в бляшках кожи у наших пациентов повышен относительно такового в непораженной коже, от 1,7 раза (наблюдение 10П) до 6,5 раза (наблюдение 6П). В среднем уровень экспрессии гена в пораженной псориазом коже повышен в $3,5 \pm 1,7$ раза (рис. 3).

Экспрессия гена *MMP-9* в атеросклеротических бляшках была повышена, относительно таковой в контроле, в среднем в $28,7 \pm 25$ раза. Зафиксировали минимальное повышение экспрессии (наблюдение 2А) в 7,2 раза, а максимальное (наблюдение 1А) — в 86,2 раза.

Таким образом, экспрессия гена *MMP-9* была повышена, по отношению к контролю, как в псориазных, так и в атеросклеротических образцах.

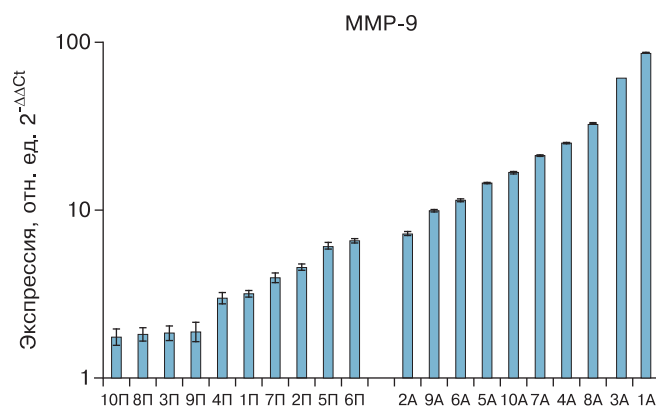


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *MMP-9* в пораженной псориазом коже и атеросклеротических бляшках сосудов у разных больных по сравнению с непораженными. П — псориазные образцы, А — атеросклеротические образцы.

Результаты, полученные с помощью ПЦР-РВ, свидетельствуют о повышении экспрессии гена *MMP-9* у всех пациентов как в пораженной атеросклерозом части сосуда, так и в пораженной псориазом коже.

Впервые повышение экспрессии *MMP-9* при псориазе обнаружено в 1997 г. группой С. Feliciani и соавт. [15]. Полученное нами повышение экспрессии *MMP-9* может быть связано с наличием в промоторе гена сайта связывания транскрипционного фактора NF-kB [17], активность которого повышена при псориазе, являющемся системным воспалительным процессом. В ряде опубликованных работ [19—21] экспериментально показана повышенная экспрессия компонента FRA-1 транскрипционного комплекса AP-1 в пораженной псориазом коже относительно непораженной. В свою очередь, патологическая активация экспрессии гена FRA-1 как компонента транскрипционного комплекса AP-1 может приводить к повышению экспрессии гена IL-2, стимуляции аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, увеличению синтеза провоспалительных цитокинов и аутоантител [22] и в итоге усиливать развитие местного воспалительного процесса, что является основой формирования и развития как псориазных так и атеросклеротических бляшек. Повышенная экспрессия гена FRA-1 вызывает усиление экспрессии гена IL-18, который, в свою очередь, индуцирует транскрипцию гена *MMP-9* и синтез активной формы MMP [23]. Данная стимуляция провоцирует усиление миграции гладкомышечных клеток, что является одним из важных этапов образования атеросклеротической бляшки [23]. Таким образом, можно сделать вывод о возможной ключевой роли гена *MMP-9* в патогенезе псориаза и атеросклероза.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» ГК 16.512.11.2049 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК П1309.

ЛИТЕРАТУРА

1. Parks W.C., Wilson C.L., Lopes-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(8): 617—29.
2. Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological function and clinical implications. *Bratisl. Lek. Listy.* 2005; 106(3): 127—32.
3. Elkington P.T., O'Kane C.M., Friedland J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 142(1): 12—20.
4. Manicone A.M., McGuire K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008; 19(1): 34—41.
5. Van Den Steen P.E., Wuyts A., Husson S.J., Proost P., Van Damme J., Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270(18): 3739—49.
6. Ichikawa Y., Ishikawa T., Momiyama N., Kamiyama M., Sakurada H., Matsuyama R., et al. Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells. *Oncol. Rep.* 2006; 15(2): 311—5.
7. Meijer M.J., Mieremet-Ooms M.A., van der Zon A.M., van Duijn W., van Hogezaand R.A., Sier C.F., et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Dig. Liver Dis.* 2007; 39(8): 733—9.
8. Stähle-Bückdahl M., Sandstedt B., Bruce K., Lindahl A., Jiménez M.G., Vega J.A., López-Otín C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 1997; 76(5): 717—28.
9. Newby A.C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationships to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28(12): 2108—14.
10. Rodriguez J.A., Orbe J., Paramo J.A. Metalloproteases, vascular remodeling, and atherothrombotic syndromes. *Rev. Esp. Cardiol.* 2007; 60(9): 959—67.
11. Raffetto J.D., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases in venous tissue remodeling and varicose vein formation. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2008; 6(3): 158—72.
12. Vasku V., Bienertova Vasku J., Slonková V., Kanková K., Vasku A. Matrix metalloproteinase-2 promoter variability in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 2009; 301(6): 467—73.
13. Lee S.E., Lew W. The increased expression of matrix metalloproteinase-9 messenger RNA in the non-lesional skin of patients with large plaque psoriasis vulgaris. *Ann. Dermatol.* 2009; 21(1): 27—34.
14. Flisiak I., Zaniewski P., Chodyncka B. Plasma TGF-beta1, TIMP-1, MMP-1 and IL-18 as a combined biomarker of psoriasis activity. *Biomarkers.* 2008; 13(5): 549—56.
15. Feliciani C., Vitullo P., D'orazi G., Palmirotta R., Amerio P., Pour S.M., et al. The 72-kDa and the 92-kDa gelatinases, but not their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, are expressed in early psoriatic lesions. *Exp. Dermatol.* 1997; 6(6): 321—7.
16. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402—8.
17. Fanjul-Fernández M., Folgueras A.R., Cabrera S., López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1803(1): 3—19.
18. Fleischmajer R., Kuroda K., Hazan R., Gordon R.E., Lebowitz M.G., Sapadin A.N., et al. Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115(5): 771—7.
19. Пирюзян Э.С., Соболев В.В., Абдеев Р.М., Золотаренко А.Д., Николаев А.А., Саркисова М.К. и др. Изучение молекулярных механизмов патогенеза иммуноопосредованных воспалительных заболеваний на примере псориаза. *Acta Naturae.* 2009; 3: 139—50.
20. Соболев В.В., Золотаренко А.Д., Соболева А.Г., Елкин А.М., Ильина С.А., Серов Д.Н. и др. Влияние экспрессии гена FOSL1 транскрипционного фактора AP-1 на псориазический процесс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 150(11): 564—7.
21. Соболев В.В., Золотаренко А.Д., Соболева А.Г., Саутин М.Е., Ильина С.А., Саркисова М.К. и др. Экспрессия гена FOSL1 при псориазе и атеросклерозе. *Генетика.* 2010; 46(1): 104—10.
22. Gonsky R., Deem R., Hughes C., Targan S.R. Activation of the CD2 pathway in lamina propria T cells up-regulates functionally active AP-1 binding to the IL-2 promoter, resulting in messenger RNA transcription and IL-2 secretion. *J. Immunol.* 1998; 160(10): 4914—22.
23. Chandrasekar B., Mummidi S., Mahimainathan L., Patel D.N., Bailey S.R., Imam S.Z., et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(22): 15099—109.

Поступила 12.11.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 616.517-085.373

Антицитокиновая терапия тяжелых форм псориаза

Г.Н. Тарасенко, С.А. Белякин, Н.Н. Рыжман, Ю.В. Кузьмина

ФГКУ 3-й Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневского (начальник — проф. С.А. Белякин) Минобороны России, Красногорск, Московская область

Авторы приводят данные антицитокиновой терапии тяжелых форм псориаза в многопрофильном учреждении. Представлен опыт применения инфликсимаба и устекинумаба у 8 и 2 пациентов соответственно. Показано развитие анафилактической реакции у пациента после введения инфликсимаба. Установлено, что устекинумаб открывает новую страницу в терапии тяжелых форм псориаза и является перспективным препаратом антицитокиновой терапии, в том числе при непереносимости или неэффективности инфликсимаба.

Сведения об авторах:

Тарасенко Григорий Николаевич — канд. мед. наук, доцент (drtarasenko@yandex.ru); Белякин Сергей Анатольевич — д-р мед. наук, проф.; Рыжман Николай Николаевич — канд. мед. наук; Кузьмина Юлия Валентиновна — врач высшей категории.