

## Изменение экспрессии гена *STAT3* при лечении псориаза

**В.В. Соболев**<sup>1,2✉</sup>, ORCID: 0000-0003-4779-156X, e-mail: vlsobolew@gmail.com

**Е.В. Денисова**<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-4887-284X, e-mail: evdenissova@rambler.ru

**И.М. Корсунская**<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-6583-0318, e-mail: marykor@bk.ru

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., д. 5

<sup>2</sup> Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии; 109029, Россия, Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30

### Резюме

**Введение.** Псориаз является типичным комплексным мультигенным и мультифакторным заболеванием с гетерогенной генетической наследуемостью, для проявления которого необходимо взаимодействие генов как друг с другом, так и с факторами окружающей среды. *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) совсем недавно стал рассматриваться как один из ключевых игроков в развитии и патогенезе псориаза и псориатических воспалительных состояний.

**Цель исследования.** Изучение экспрессии гена *STAT3* в пораженной части кожи больных псориазом по отношению к визуально непораженной части. Изучение изменения уровня экспрессии гена *STAT3* в пораженной псориазом коже по сравнению с непораженной у больных до и после лечения лазерным излучением низкой интенсивности с длиной волны 1,27 мкм.

**Материалы и методы.** В исследовании участвовали 12 больных псориазом. Биопсии из непораженных участков кожи брали на расстоянии около 3 см от пораженной кожи. Анализ проводили методом ПЦР в реальном времени.

**Результаты и обсуждение.** Проведено количественное измерение экспрессии гена *STAT3* с помощью ПЦР-РВ в пораженной части кожи больных псориазом по отношению к визуально непораженной части кожи у тех же пациентов до и после лечения лазерным излучением низкой интенсивности с длиной волны 1,27 мкм (коротковолновая часть инфракрасного диапазона). В результате исследования было экспериментально показано увеличение экспрессии гена *STAT3* в пораженной части кожи больных псориазом в среднем в 3,96 ± 2 раза. Уменьшение экспрессии гена наблюдалось в пораженной псориазом коже по сравнению с образцами непораженных участков. После лечения пациентов лазерным излучением низкой интенсивности наблюдалось достоверное снижение экспрессии сверхэкспрессированного гена *STAT3* до 1,75 ± 0,5 раза.

**Выводы.** Транскрипционная активность гена *STAT3* может являться индикатором эффективности лечения псориаза на молекулярном уровне, а также стать новой терапевтической мишенью.

**Ключевые слова:** псориаз, *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), экспрессия гена, ПЦР-РВ, лазерное излучение низкой интенсивности

**Для цитирования:** Соболев В.В., Денисова Е.В., Корсунская И.М. Изменение экспрессии гена *STAT3* при лечении псориаза. *Медицинский совет.* 2020;(12):71–74. doi: 10.21518/2079-701X-2020-12-71-74.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Alteration of *STAT3* gene expression in psoriasis treatment

**Vladimir V. Sobolev**<sup>1,2✉</sup>, ORCID: 0000-0003-4779-156X, e-mail: vlsobolew@gmail.com

**Elena V. Denisova**<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-4887-284X, e-mail: evdenissova@rambler.ru

**Irina M. Korsunskaya**<sup>2</sup>, ORCID: 0000-0002-6583-0318, e-mail: marykor@bk.ru

<sup>1</sup> Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera; 5a, Malyy Kazenny Lane, Moscow, 105064, Russia

<sup>2</sup> Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences; 30, Srednyaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109029, Russia

### Abstract

**Introduction.** Psoriasis is a typical complex multigenic and multifactorial disease with heterogeneous genetic heredity, which requires the interaction of genes both with each other and with environmental factors. *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) has only recently been considered a key player in the development and pathogenesis of psoriasis and psoriatic inflammatory conditions.

**Aim of the study.** To study the expression of the *STAT3* gene in the affected part of the skin of psoriasis patients in relation to the visually unaffected part. To study the change in the *STAT3* gene expression level in psoriasis-affected skin as compared to non-affected skin in patients before and after treatment with low-level laser radiation at a wavelength of 1.27 μm.

**Materials and methods.** The study involved 12 psoriasis patients. Biopsies from the unaffected skin were taken at a distance of about 3 cm from the affected skin. Real-time PCR analysis was performed.

**Results and discussion.** The expression of the *STAT3* gene was quantitatively measured using RT-PCR in the affected part of the skin of psoriasis patients compared to the visually unaffected part of the skin of the same patients before and after treatment with low-level laser radiation with a wavelength of 1.27 μm (short-wave infrared). As a result of the study, an increase in the expression of the *STAT3* gene in the affected part of the skin of psoriasis patients of an average of 3.96 ± 2 times was experimentally shown. A decrease in gene expression was observed in psoriasis affected skin compared to samples of non-affected areas. After treatment of patients with low-level laser radiation, a significant reduction in the expression of the overexpressed *STAT3* gene to 1.75 ± 0.5 times was observed.

**Conclusions.** The transcription activity of the *STAT3* gene can be an indicator of the efficacy of psoriasis treatment at the molecular level and can also be a new therapeutic target.

**Keywords:** psoriasis, *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), gene expression, RT-PCR, low-level laser radiation

**For citation:** Sobolev V.V., Denisova E.V., Korsunskaya I.M. Alteration of gene expression in psoriasis treatment. *Meditsinskiy sovet = Medical Council.* 2020;(12):71–74. (In Russ.) doi: 10.21518/2079-701X-2020-12-71-74.

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Псориаз – это хроническое воспалительное заболевание кожи, которым болеют от 2 до 3% людей во всем мире [1]. Псориаз бляшечного типа (также известный как вульгарный псориаз – *Psoriasis vulgaris*) является наиболее распространенным клиническим вариантом, на который приходится примерно 85% случаев, характеризуется толстыми эритематозными бляшками, покрытыми серебристыми пластинчатыми чешуйками, преимущественно локализованными на разгибательных поверхностях, коже черепа и туловища [2].

Основной причиной развития псориаза является хроническое взаимодействие между гиперпролиферативными кератиноцитами и инфильтрирующими активированными иммунными клетками. Первоначально считалось, что псориаз возникает исключительно из-за пролиферативной дисфункции кератиноцитов [3].

Псориаз является типичным комплексным заболеванием – мультигенным и мультифакторным с гетерогенной генетической наследуемостью, для проявления которого необходимо взаимодействие генов как друг с другом, так и с факторами окружающей среды. При семейном анализе и генотипировании больных псориазом было выяснено, что разные фенотипы болезни имеют разные локусы [4].

Локусы, связанные с псориазом, локализованы по крайней мере на 13 различных хромосомах и обозначаются как PSORS (Psoriasis Susceptibility) PSORS1-PSORS13 [5]. В пределах каждой из этих областей картирован целый ряд генов-кандидатов [6].

Изучение дифференциальной экспрессии генов в коже больных псориазом существенно расширило знание о патогенезе псориаза [7–9].

*STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) совсем недавно стал рассматриваться как один из ключевых игроков в развитии и патогенезе псориаза и псориазных воспалительных состояний [10]. Гиперактивация гена *STAT3* описана практически в каждом типе клеток, участвующих в инициации и поддержании заболевания, и этот фактор опосредует сигналинг большинства цитокинов, участвующих в патогенезе заболевания, включая основные интерлейкины – IL-23, IL-17, IL-22 [11–13].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Забор биопсий* осуществлялся у пациентов, проходивших лечение в клинике им. В.Г. Короленко Московского научно-практического центра дерматовенерологии и косметологии с установленным диагнозом «псориаз бляшечного типа (*Psoriasis vulgaris*)». Возраст пациентов варьировал от 25 до 56 лет (*табл.*). Диагноз "*Psoriasis vulgaris*" в каждом случае устанавливался клинически и был подтвержден путем патоморфологического изучения биоптатов кожи.

*Забор пораженного и непораженного участков кожи* больных псориазом проводили под местной анестезией с помощью дерматологического пробойника (4 мм).

● **Таблица.** Клинические показатели больных псориазом (*Psoriasis vulgaris*)

● **Table.** Clinical indicators of psoriasis patients (*Psoriasis vulgaris*)

	Пациенты с основным диагнозом «псориаз» (n = 23)
Возраст	43,5 ± 8,8
Пол, n (%)	
• мужчины	10 (43,5%)
• женщины	13 (56,5%)
PASI	22,1 ± 6,25

Биопсии из непораженных участков кожи брали на расстоянии около 3 см от пораженной кожи. Исследование одобрено локальным комитетом по этике при Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и соответствует принципам, изложенным в декларации Хельсинского соглашения.

*Выделение РНК* из биопсий проводили на колонках Qiagen по стандартному протоколу RNeasy Mini Kit® для кожи. Для освобождения препаратов РНК от примесей ДНК проводили обработку ДНКазой Qiagen. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США), после чего образцы выравнивали по концентрации в ddH<sub>2</sub>O.

*Обратную транскрипцию* проводили следующим образом. В пробирки для ПЦР объемом 200 мкл вносили: буфер, dNTP, 100 ед. обратной транскриптазы M<sub>MLV</sub> (Promega), 20 ед. ингибитора РНКазы RNasin (Promega), 500 нг oligo(dT) праймеров (ДНК\_Синтез) и РНК до конечной концентрации не более 100 нг/мкл. Смесь термостатировали 1 ч при 37 °С.

ПЦР в реальном времени проводили в 96-луночных оптических планках с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green (Евроген, Россия). Праймеры и пробы были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез».

Аmplификацию проводили в ПЦР-амплификаторе (Bio-Rad, CFX96™), используя следующую программу: (1) денатурация при 95 °С в течение 4 мин, (2) денатурация при 94 °С в течение 15 с, (3) отжиг при 55 °С в течение 15 с, (4) элонгация при 72 °С в течение 15 с, (5) этапы 2–4 повторяли 50 раз. Экспрессию генов-мишеней нормализовали на ген домашнего хозяйства GAPDH. Амплификация гена *GAPDH* и исследуемых генов проводилась в разных пробирках.

Для обсчета результатов использовались данные реакции ПЦР в реальном времени со следующими параметрами: эффективность праймеров в реакции ПЦР в реальном времени не менее 95%; коэффициент корреляции не менее 0,99; наклон кривой (slope) -3,4 ± 0,2.

Обработку результатов полимеразной цепной реакции проводили методом 2<sup>-ΔΔCt</sup>, который показывает, во сколько раз изменяется экспрессия гена в пораженном образце по сравнению с непораженным [14]. ΔΔCt рассчитывалось как ΔΔCt = ΔCt (пораженной кожи) – ΔCt (непораженной кожи) и каждое значение ΔCt = Ct (исследуемый ген) – Ct (*GAPDH*). Эксперименты проводили в трехкратной повторности для каждого образца.

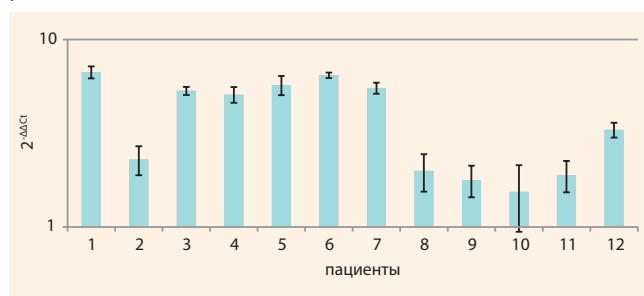
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В своей работе мы сравнивали уровни экспрессии гена *STAT3* в пораженной части кожи больных псориазом по отношению к визуально непораженной части кожи, находящейся на расстоянии не менее 3 см от пораженной псориазической кожи одного и того же больного. Такое сравнение позволяет максимально исключить влияние побочных факторов на чистоту эксперимента [15]. Используя метод ПЦР в реальном времени, был проведен анализ уровня экспрессии гена *STAT3* в пораженной псориазом коже по сравнению с непораженной у 12 больных.

При индивидуальном анализе каждого больного было показано, что уровень экспрессии гена *STAT3* у всех пациентов повышен относительно контроля, и повышается в диапазоне от 1,6 раза (пациент 10) до 6,7 раза (пациент 1) (рис. 1). В среднем экспрессия гена *STAT3* у пациентов оказалась повышенной в пораженной коже относительно визуально непораженной в  $3,96 \pm 2$  раза.

● **Рисунок 1.** Уровень экспрессии мРНК гена *STAT3* в пораженной коже пациентов по отношению к уровню содержания в визуально непораженной псориазом коже, принятому за 1

● **Figure 1.** Expression level of *STAT3* gene mRNA in affected skin of patients compared to the level in visually unaffected psoriasis skin taken for 1

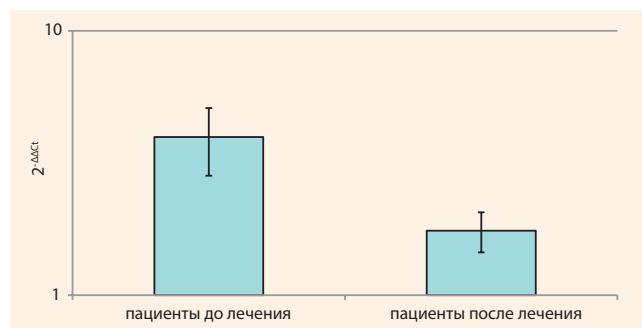


На следующем этапе работы, для дополнительной верификации полученных результатов мы сравнили изменение уровня экспрессии гена *STAT3* в пораженной псориазом коже по сравнению с непораженной у 12 больных до и после лечения лазерным излучением низкой интенсивности с длиной волны 1,27 мкм (коротковолновая часть инфракрасного диапазона).

После лечения пациентов лазерным излучением низкой интенсивности с длиной волны 1,27 мкм наблюдалось достоверное снижение экспрессии сверхэкспрессированного гена *STAT3* до  $1,75 \pm 0,5$  раза у исследуемой группы пациентов (рис. 2).

● **Рисунок 2.** Сравнение уровня экспрессии гена *STAT3* непараметрическим методом Манна – Уитни в образцах пораженной псориазом кожи до и после лечения низкоинтенсивным лазерным излучением ( $p < 0,01$ ). За 1 принят уровень экспрессии в визуально непораженной коже

● **Figure 2.** Comparison of the level of *STAT3* gene expression by the non-parametric Mann-Whitney method in samples of psoriasis-affected skin before and after low-level laser treatment ( $p < 0.01$ )



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в пораженной псориазом коже происходит активация экспрессии гена *STAT3*, что позволяет предположить, что дефектная активация внутриклеточного пути, управляемого *STAT3*, может способствовать поддержанию повреждающего кожу иммуно-воспалительного ответа при псориазе.

*STAT3*, участвующий в передаче внеклеточных сигналов в ядро, является возможной важной связью между кератиноцитами и иммунными клетками и имеет решающее значение для развития псориаза [16]. Ранее, другими исследователями было показано, что применение различных способов лечения псориаза снижает уровень экспрессии *STAT3* в пораженной коже [17, 18].

*STAT3* является ключевым положительным регулятором экспрессии транскрипционного фактора *RORγ* и связывается с промотером *IL-17*. Повышенная экспрессия *STAT3* и *RORγ* необходима для развития клеток Th17 и координации их дифференцировки [19, 20].

Учитывая перечисленные факты в сочетании с собственными результатами, мы пришли к выводу, что транскрипционная активность гена *STAT3* может являться индикатором эффективности лечения псориаза на молекулярном уровне, а также стать новой терапевтической мишенью.



Поступила / Received 22.08.2020

Поступила после рецензирования / Revised 24.09.2020

Принята в печать / Accepted 28.09.2020

## Список литературы / References

- Christophers E. Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26(4):314–320. doi: 10.1046/j.1365-2230.2001.00832.x.
- Boehncke W.H., Schön M.P. Psoriasis. *Lancet.* 2015;386(9997):983–994. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7.
- Di Cesare A., Di Meglio P., Nestle F.O. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1339–1350. doi: 10.1038/jid.2009.59.
- Samuelsson L., Enlund F., Torinsson A., Yhr M., Inerot A., Enerbäck C. et al. A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet.* 1999;105(6):523–529. doi: 10.1007/s004399900182.
- Merve H.M., Sevilyay K., Sibel O., Basac B., Ceren C.G., Demirci T., Cüneyt A. Psoriasis and Genetics. In: Chiriac A. (ed.) *An Interdisciplinary Approach to Psoriasis.* 2017. doi: 10.5772/intechopen.68344.

6. Barker J.N. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26(4):321–325. doi: 10.1046/j.1365-2230.2001.00830.x.
7. 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):104–110. Режим доступа: <http://www.vigg.ru/genetika>.  
Sobolev V.V., Zolotareno A.D., Soboleva A.G., Sautin M.E., Il'ina S.A., Sarkisova M.K. et al. Expression of the FOSL1 gene in psoriasis and atherosclerosis. *Genetika = Russian Journal of Genetics.* 2010;46(1):104–110. (In Russ.) Available at: <http://www.vigg.ru/genetika>.
8. Sobolev V.V., Zolotareno A.D., Soboleva A.G., Elkin A.M., Il'ina S.A., Serov D.N. et al. Effects of Expression of Transcriptional Factor AP-1 FOSL1 Gene on Psoriatic Process. *Bull Exp Biol Med.* 2011;150(5):632–634. doi: 10.1007/s10517-011-1208-0.
9. Sobolev V.V., Nikol'skaya T.A., Zolotareno A.D., Piruzyan E.S., Bruskin S.A. Expression of bioinformatically identified genes in skin of psoriasis patients. *Russ J Genet.* 2013;49(10):1057–1064. doi: 10.1134/S1022795413100116.
10. Calautti E., Avalle L., Poli V. Psoriasis: A STAT3-Centric View. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):171. doi: 10.3390/ijms19010171.
11. Sestito R., Madonna S., Scarponi C., Cianfarani F., Failla C.M., Cavani A. et al. STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. *FASEB J.* 2011;25(3):916–927. doi: 10.1096/fj.10-172288.
12. Yang X.O., Panopoulos A.D., Nurieva R., Chang S.H., Wang D., Watowich S.S., Dong C. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem.* 2007;282(13):9358–9363. doi: 10.1074/jbc.C600321200.
13. Harris T.J., Grosso J.F., Yen H.-R., Xin H., Kortylewski M., Albesiano E. et al. Cutting Edge: An In Vivo Requirement for STAT3 Signaling in T<sub>H</sub>17 Development and T<sub>H</sub>17-Dependent Autoimmunity. *J Immunol.* 2007;179(7):4313–4317. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4313.
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
15. Yao Y., Richman L., Morehouse C., de los Reyes M., Higgs B.W., Boutrin A. et al. Type I Interferon: Potential Therapeutic Target for Psoriasis? *PLoS One.* 2008;3(7):e2737. doi: 10.1371/journal.pone.0002737.
16. Chowdhari S., Saini N. hsa-miR-4516 Mediated Downregulation of STAT3/CDK6/UBE2N Plays a Role in PUVA Induced Apoptosis in Keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1630–1638. doi: 10.1002/jcp.24608.
17. Grabarek B., Wcislo-Dziadecka D., Gola J., Kruszewska-Rajs C., Brzezinska-Wcislo L., Zmarzly N., Mazurek U. Changes in the Expression Profile of JAK/STAT Signaling Pathway Genes and Mirnas Regulating their Expression Under the Adalimumab Therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(7):556–565. doi: 10.2174/1389201019666180730094046.
18. Grabarek B., Krzaczyński J., Strzałka-Mrozik B., Wcislo-Dziadecka D., Gola J. The influence of ustekinumab on expression of STAT1, STAT3, STAT4, SOCS2, and IL17 in patients with psoriasis and in a control. *Dermatol Ther.* 2019;32(5):e13029. doi: 10.1111/dth.13029.
19. Bovenschen H.J., van de Kerkhof P.C., van Erp P.E., Woestenenk R., Joosten I., Koenen H.J. Foxp3+ Regulatory T Cells of Psoriasis Patients Easily Differentiate into IL-17A-Producing Cells and Are Found in Lesional Skin. *J Invest Dermatol.* 2011;131(9):1853–1860. doi: 10.1038/jid.2011.139.
20. Shu Y., Hu Q., Long H., Chang C., Lu Q., Xiao R. Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017;52(2):260–272. doi:10.1007/s12016-016-8590-3.

#### Информация об авторах:

**Соболев Владимир Васильевич**, к.б.н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., д. 5; старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; 109029, Россия, Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30; SPIN-код: 3035-8570; e-mail: vlsobolev@gmail.com

**Денисова Елена Валерьевна**, к.м.н., старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; 109029, Россия, Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30; e-mail: evdenissova@rambler.ru

**Корсунская Ирина Марковна**, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией физико-химических и генетических проблем дерматологии; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»; 109029, Россия, Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30; SPIN-код: 3335-2019; e-mail: marykor@bk.ru

#### Information about the authors:

**Vladimir V. Sobolev**, Cand. of Sci. (Bio.), Senior Researcher, Federal State Budget Scientific Institution “Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera”; 5a, Malyy Kazenny Lane, Moscow, 105064, Russia; Senior Researcher, Federal State Budgetary Institution of Science “Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences”; 30, Srednyaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109029, Russia; e-mail: vlsobolev@gmail.com

**Elena V. Denisova**, Cand. of Sci. (Med.), Senior Researcher, Federal State Budgetary Institution of Science “Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences”; 30, Srednyaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109029, Russia; e-mail: evdenissova@rambler.ru

**Irina M. Korsunskaya**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory for Physicochemical and Genetic Problems in Dermatology; Federal State Budgetary Institution of Science “Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences”; 30, Srednyaya Kalitnikovskaya St., Moscow 109029, Russia; e-mail: marykor@bk.ru