

Результаты изучения генетических факторов предрасположенности к псориазу среди населения Российской Федерации

А.А. Минеева, О.С. Кожушная, Л.Ф. Знаменская, В.В. Чикин, Н.В. Фриго

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Цель. Оценка частоты встречаемости в российской популяции генов предрасположенности к псориазу выбранными методами молекулярно-генетических исследований.

Материал и методы. Методами аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени и ПДРФ-анализа (анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов) в образцах цельной крови, полученных от 45 больных псориазом, были изучены однонуклеотидные полиморфизмы фрагментов 13-и генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию псориаза: rs4649203 (ген *IL-28RA*), rs11209026 (ген *IL-23R*), rs610604 (ген *TNFAIP3*), rs514315 (ген *SERPINB8*), rs9304742 (ген *ZNF816A*), rs17728338 (ген *TNIP1*), rs13190932 (ген *TRAF3IP2*), rs2235617 (ген *ZNF313*), rs27524 (ген *ERAP1*), rs702873 (ген *REL*), rs3213094 (ген *IL-12B*), rs12720356 (ген *TYK2*), rs8016947 (ген *NFKB1*).

Результаты. Впервые на российской выборке пациентов получен массив данных о структуре и частоте встречаемости генотипов в соответствующих позициях 13 генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию псориаза. На данном этапе исследования достоверных отличий в частоте встречаемости отдельных генотипов между больными псориазом и здоровыми выявлено не было ввиду относительной малочисленности выборки. Исключение составил ген *TYK2* (rs1272035). Гомозиготный *T/T* генотип достоверно чаще ($p < 0,01$) встречался у больных псориазом (95,6%) в сравнении со здоровыми (77,8%), что позволяет рассматривать носителей данного генотипа как лиц с предрасположенностью к развитию псориаза.

Ключевые слова: псориаз, предрасположенность, гены, SNP, аллель-специфическая гибридизация, ПЦР в реальном времени, ПДРФ-анализ, молекулярно-генетические методы.

Контактная информация: chikin@cnikvi.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2013; (5): 78—90.

Results of a study of genetic factors predisposing to the development of psoriasis among the population of the Russian Federation

A.A. Mineyeva, O.S. Kozhushnaya, L.F. Znamenskaya, V.V. Chikin, N.V. Frigo

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

Goal. To assess the incidence of genes predisposing to the development of psoriasis based on selected molecular and genetic study methods among the Russian population.

Materials and methods. By using allele specific hybridization methods in the form of real-time PCR and RFLP assay (Restriction Fragment Length Polymorphism), single-nucleotide polymorphisms of fragments of 13 genes associated with predisposition to the development of psoriasis were studied in whole blood samples obtained from 45 psoriatic patients: rs4649203 (gene *IL-28RA*), rs11209026 (gene *IL-23R*), rs610604 (gene *TNFAIP3*), rs514315 (gene *SERPINB8*), rs9304742 (gene *ZNF816A*), rs17728338 (gene *TNIP1*), rs13190932 (gene *TRAF3IP2*), rs2235617 (gene *ZNF313*), rs27524 (gene *ERAP1*), rs702873 (gene *REL*), rs3213094 (gene *IL-12B*), rs12720356 (gene *TYK2*), and rs8016947 (gene *NFKB1*).

Results. A set of data on the genotype structure and incidence in respective loci of 13 genes associated with predisposition to develop psoriasis was obtained for the first time based on a Russian sample of patients. At this stage of the study, we failed to reveal any reliable differences concerning the incidence of individual genotypes between psoriatic patients and healthy people because of the small size of the sample. Gene *TYK2* (rs1272035) served as an exclusion. The homozygous *T/T* genotype was revealed more often ($p < 0.01$) in psoriatic patients (95.6%) vs. healthy people (77.8%), which makes it possible to consider the carriers of this genotype as people predisposed to the development of psoriasis.

Key words: psoriasis, predisposition, genes, SNP, allele specific hybridization, real-time PCR, RFLP assay, molecular and genetic methods.

Corresponding author: chikin@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; 5: 78—90.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» на период 2012—2014 гг. Раздел I. Выполнение фундаментальных научных исследований. Наименование темы: «Изучение генетических факторов предрасположенности к развитию псориаза» по Государственному контракту 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012 г.)

■ Псориаз — воспалительное иммуноассоциированное заболевание мультифакториальной природы с доминирующей ролью генетических факторов [1—3]. Показатели заболеваемости населения псориазом в разных регионах мира варьируют от 0,6 до 5%, составляя в среднем 3% [4, 5]. В Российской Федерации заболеваемость псориазом, по данным официального государственного статистического учета, в 2010—2011 годах составила около 1% [4].

Эпидемиологические исследования, проведенные в XX веке, в ходе которых это заболевание изучалось в нескольких поколениях родственников, создали основу формирования генетической теории псориаза. В результате последующих работ было установлено значение генов, кодирующих белки главного комплекса гистосовместимости классов I и II, в развитии псориаза [6].

Широкомасштабные мультицентровые исследования, осуществляющиеся с начала XXI века по Программе полногеномного анализа ассоциаций GWAS (Genome-wide association studies), направленные на выявление ассоциаций между генотипом и фенотипом человека, определили спектр различных генетических маркеров предрасположенности к псориазу; результаты этой работы представлены в базе данных Национального института здоровья США, доступной для исследователей в сети Интернет [7], и широко используются в качестве основы для молекулярно-генетических исследований в различных регионах мира.

В результате проведенных исследований была установлена роль в развитии псориаза одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), локализованных как в структуре генов главного комплекса гистосовместимости, так и в других регионах генома человека [8]. При этом изменение одного нуклеотида в молекуле ДНК оценивается как значимое, регистрируется в информационных базах данных и включается в эпидемиологические исследования, если частота его встречаемости в популяции превышает 1% [9]. К началу 2001 года в геноме человека было обнаружено более 1,5 миллиона SNP, информация о них также помещена в общедоступные базы данных [10], что создало возможность изучения генетической основы ряда мультифакториальных заболеваний в популяциях.

Геномные исследования, осуществляемые по Программе GWAS, проводятся с использованием специально разработанных биологических микрочипов высокой плотности (например, микрочипов формата Illumina Nap310K и Illumina Nap550K) [12], представляющих собой твердофазную подложку, на которой иммобилизованы изучаемые последовательности ДНК [15]. Высокая стоимость этого метода исследования и отсутствие репрезентативных ДНК-банков, основанных на получении, выделении и хранении образцов ДНК, полученных от больных мультифакториальными заболеваниями, задерживает внедрение данной технологии в России. В связи с этим представляется рациональным изучение уже известных маркеров заболевания, в частности, выявленных методом GWAS, у больных псориазом в российской популяции.

Следует отметить, что до настоящего времени в Российской Федерации крупных исследований по изучению частоты выявления представленных в международных базах данных генетических маркеров, ассоциированных с развитием псориаза, не проводилось; в научных публикациях имеются сообщения об идентификации лишь отдельных маркеров [11, 13—14]. В связи с вышеизложенным для выполнения настоящего исследования на основании анализа данных информационной базы GWAS нами были отобраны [27] гены, отвечающие за нарушение барьерной функции кожи, участвующие в реализации врожденного и адаптивного иммунитета, а также в презентации антигена (*IL-28RA*, *IL-23R*, *TNFAIP3*, *SERPINB8*, *ZNF816A*, *TNIP1*, *TRAF3IP2*, *ZNF313*, *ERAP1*, *REL*, *IL-12B*, *NFKBI* и *TYK2*), включающие одиночные нуклеотидные полиморфизмы, описанные в зарубежной литературе как маркеры заболевания. Роль этих полиморфизмов в развитии псориаза в российской популяции не изучена.

Необходимым условием для выполнения проводимого крупномасштабного исследования по изучению распределения частот аллелей и генотипов маркеров локусов генов предрасположенности к развитию псориаза в российской популяции (планируемая популяционная выборка — не менее 500 больных псориазом и не менее 150 здоровых лиц) является определение методов, которые позволяют оптимально идентифицировать SNP.

В связи с вышеизложенным **целью настоящего исследования** явилась оценка частоты встречаемости в российской популяции генов предрасположенности к псориазу выбранными методами молекулярно-генетических исследований.

Обоснование методологии изучения генетических факторов предрасположенности к развитию псориаза в российской популяции

При выборе методологии определения SNP-маркеров были изучены известные современные методы определения SNP. Следует отметить, что ни один

современный метод генотипирования не является универсальным, однако некоторые методы генотипирования доступны для осуществления многих исследовательских проектов [15]. Представленные ниже методы применяются в случаях, когда известны первичная последовательность анализируемого фрагмента ДНК, тип и локализация выявляемой однонуклеотидной замены.

Обнаружить специфическую последовательность можно с помощью следующих основных методов типирования SNP:

- 1) аллель-специфическая гибридизация (полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени);
- 2) аллель-специфический рестрикционный анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ-анализ);
- 3) аллель-специфическая достройка или удлинение праймера;
- 4) аллель-специфическое лигирование олигонуклеотидных фрагментов.

Методы генотипирования включают стадии дискриминации аллелей¹ генов и стадии детекции продуктов дискриминации. Во всех этих методах выявление маркеров обеспечивается за счет ферментов, обладающих способностью различать комплементарную и некомплементарную пару нуклеотидных оснований (мисматч) [16—19]. Все четыре метода надежны и применяются для решения различных задач.

1. Аллель-специфическая гибридизация (полимеразная цепная реакция в реальном времени, *real-time PCR*).

Простейшим механизмом для генотипирования является аллель-специфическая гибридизация, основанная на разделении двух ДНК-мишеней (аллелей) в одном локусе гомологичных хромосом, несущих аллели изучаемого гена. Для ее проведения конструируются два аллель-специфических зонда с полиморфным основанием в центре нуклеотидной последовательности зонда. Стабильные гибридизованные зонды образуются при условии полной комплементарности оснований зонда и изучаемого образца. При несоответствии даже одной пары оснований гибридизация зонда является нестабильной (рис. 1) [28].

Основной задачей для обеспечения получения надежного результата при анализе аллельных дискриминаций является подбор оптимальных зондов. Этот механизм генотипирования реализуется в формате ПЦР в реальном времени. Реакционная смесь содержит пару праймеров для амплификации фрагмента исследуемого гена и два аллель-специфических зонда, меченных разными флуорофорами. В ходе ПЦР 5'-экзонуклеазная активность Таq-полимеразы разрушает зонд, что приводит к высвобождению флуорохрома и накоплению сигнала. Таq-полимераза разрушает зонды с высоким сродством к ПЦР-продукту. Таким образом, накопление сигнала происходит пропорционально эффективности гибридизации. Идентификация аллельных вариантов гена основана на различии эффективности гибридизации зонда в каждом цикле ПЦР с комплементарным зонду аллелем и некомплементарным аллелем (с заменой одного нуклеотида). Несмотря на то что различия эффективности

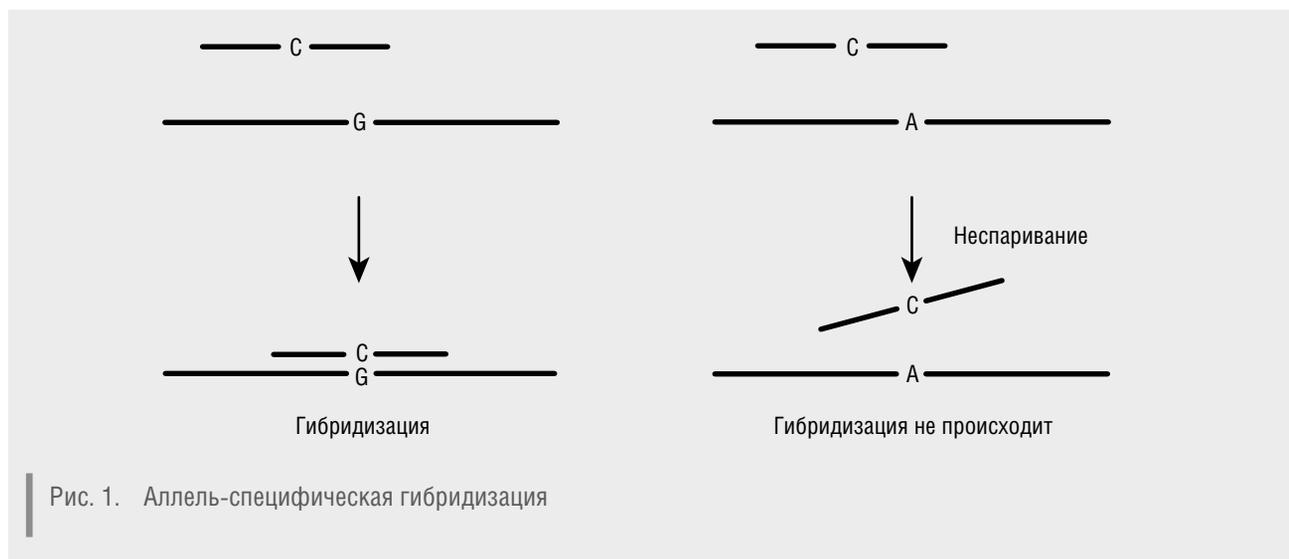


Рис. 1. Аллель-специфическая гибридизация

¹ Аллели — различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом и определяющие альтернативные варианты развития одного и того же признака.

гибридизации зондов незначительны, от цикла к циклу происходит накопление разницы в сигналах, полученных от двух зондов, что позволяет достоверно различать аллели и идентифицировать генотип в изучаемом SNP [20—21].

2. Аллель-специфический рестрикционный анализ (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ, RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism).

ПДРФ-анализ основан на выявлении сайтов рестрикции² геномной ДНК. Мутационная изменчивость ДНК в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК, гибридизующихся со специфическими ДНК-зондами. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным по-

сле завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большого размера. ПДРФ-анализ включает этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикции специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну. Метод ПДРФ широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма рестрикционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма (рис. 2) [25, 26].

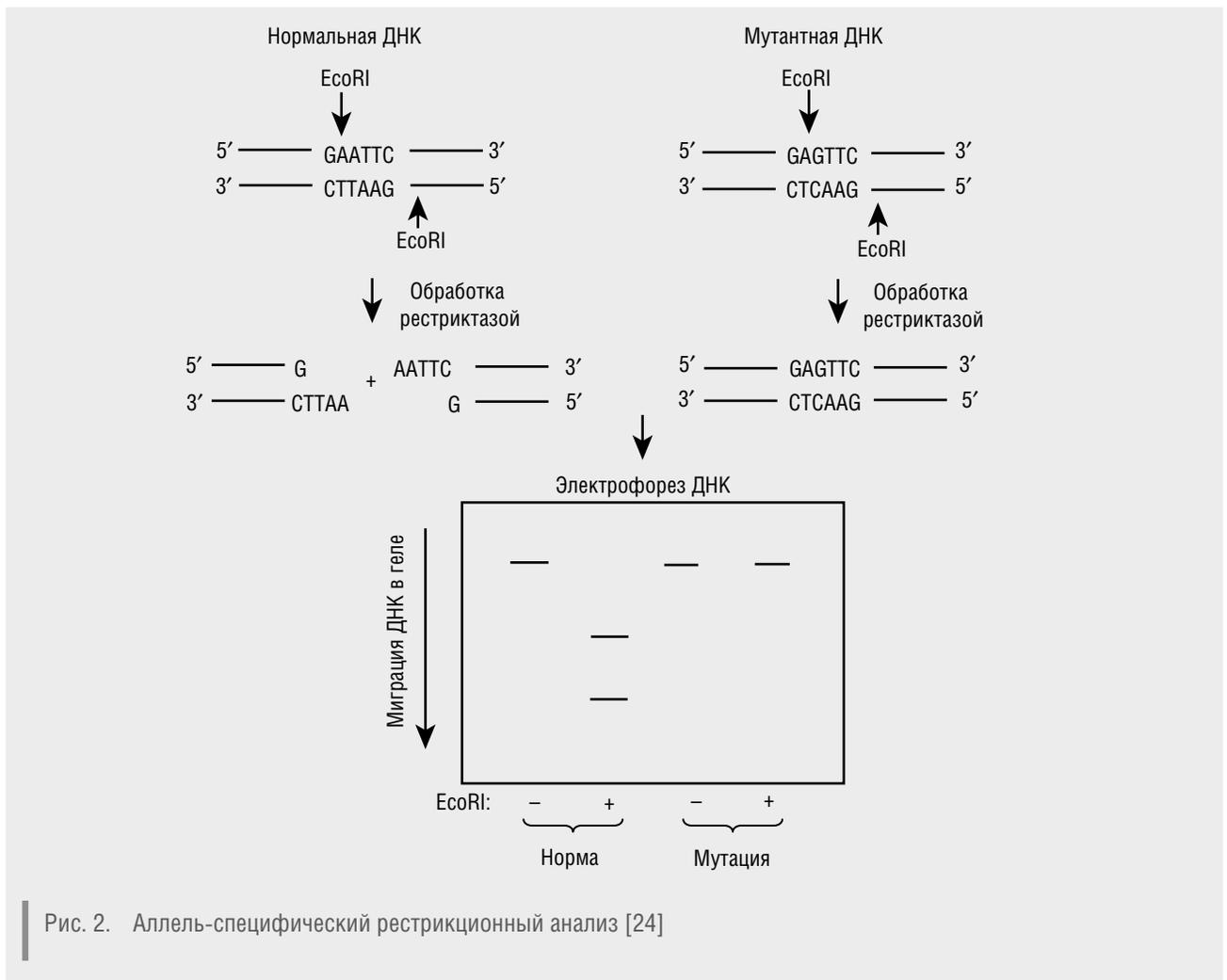


Рис. 2. Аллель-специфический рестрикционный анализ [24]

² Сайт рестрикции — строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая ферментами — рестриктазами.

3. Аллель-специфическая достройка праймера, или удлинение праймера.

Надежным механизмом аллельной дискриминации является удлинение праймера. Метод основан на способности ДНК-полимеразы включать в синтезируемую цепь дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, комплементарные ДНК-матрице. Способы удлинения праймеров включают две основные группы. К первой относят процессы удлинения праймеров с помощью отдельных нуклеотидов (минисеквенирование), где полиморфное основание определяется за счет включения ДНК-полимеразой дидезоксинуклеотидтрифосфата, комплементарного полиморфному основанию матрицы. Способы, основанные на аллель-специфичном удлинении, при котором ДНК-полимераза работает лишь в случае полного соответствия праймера последовательности цепи, относят ко второй группе. В этом случае одновременно проводят две реакции ПЦР, в каждой из которых одним из праймеров служит аллель-специфическая мутантная олигонуклеотидная последовательность или олигонуклеотидная последовательность дикого типа соответственно. Данные олигонуклеотидные последовательности несут на 3'-конце соответствующие нуклеотиды (мутантный или дикого типа). В качестве

второго праймера выступает одна и та же олигонуклеотидная последовательность, так чтобы в обеих реакциях ПЦР амплифицировались участки ДНК одинаковой длины. При определенных условиях и составе реакционной смеси наличие негомологичного спаривания на 3'-конце праймера препятствует синтезу ДНК (рис. 3).

Таким образом, при наличии SNP-маркера в исследуемой матричной ДНК амплифицированные ПЦР-продукты образуются только в том случае, если в качестве аллель-специфического праймера выбирается мутантная олигонуклеотидная последовательность, тогда как с олигонуклеотидного праймера дикого типа ПЦР-реакция блокируется. Мониторинг произошедшего удлинения праймера позволяет сделать вывод о наличии искомого(ых) аллеля(ей) в образце ДНК. Данный механизм дискриминации аллелей реализуется методом ПЦР с последующей детекцией продуктов реакции с помощью электрофоретического разделения в агарозном геле либо с помощью капиллярного электрофореза (SNaPshot метод) [22], масс-спектрометрией, ДНК-микрочипами [23] и т. д.

Однако метод является трудоемким, дорогостоящим и требует значительных затрат времени для оптимизации условий проведения реакций ПЦР [28].

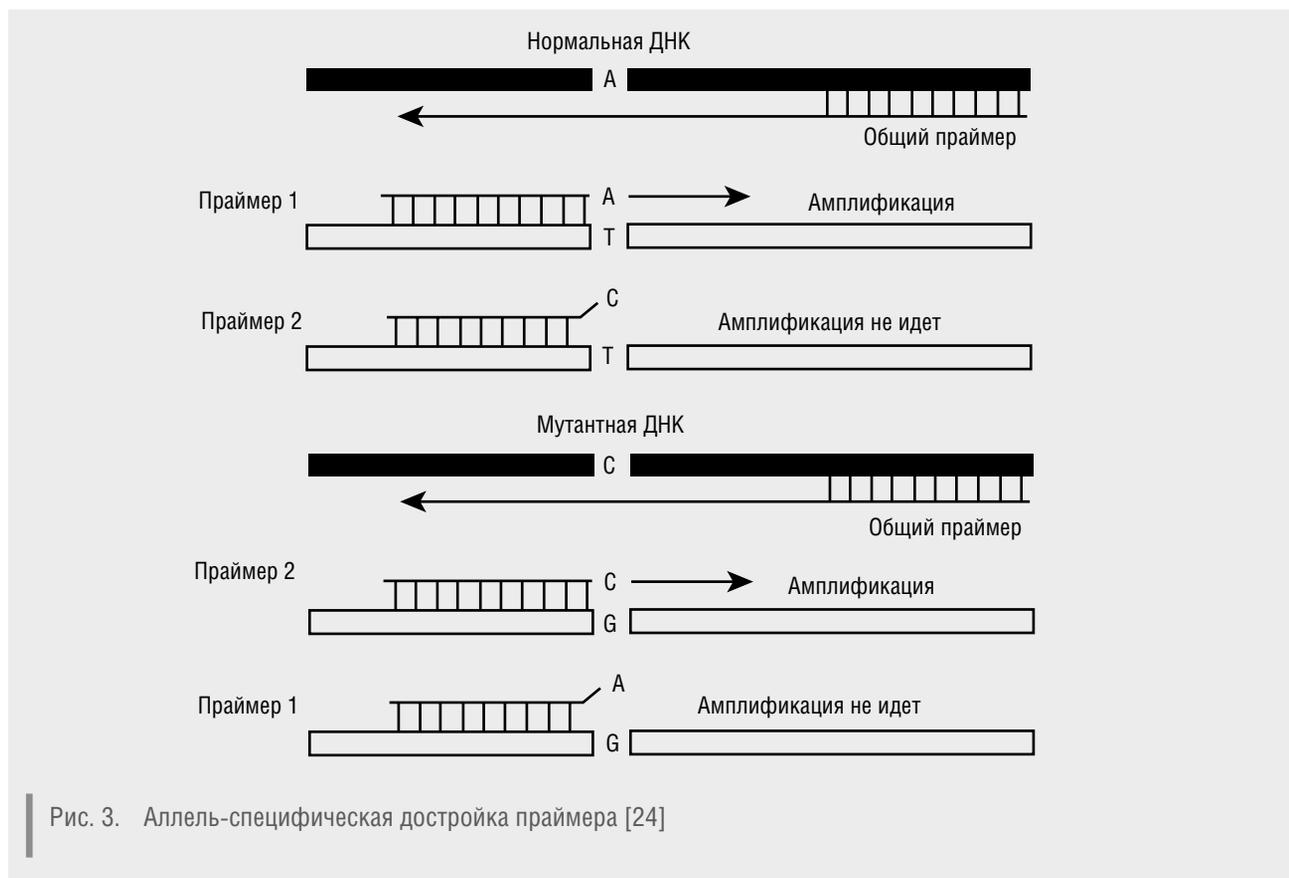


Рис. 3. Аллель-специфическая достройка праймера [24]

4. Аллель-специфическое лигирование олигонуклеотидных фрагментов.

ДНК-лигаза является высокоспецифичным ферментом, который устраняет одноцепочечные разрывы в ДНК. Метод лигирования одноцепочечных разрывов основан на способности фермента ДНК-лигазы ковалентно сшивать расположенные друг за другом нуклеотиды. В процессе реализации метода используются три зонда, которые обеспечивают точное соединение двух прилегающих последовательностей целевой ДНК. Один зонд (основной) располагается с 5'-стороны от SNP. Два других зонда — аллель-специфические, меченые различными красителями, отличаются 3'-нуклеотидом, соответствующим позиции SNP [28]. Процесс исследования включает несколько циклов гибридизации, лигирования и денатурации. В ходе лигирования происходит сшивание основного и аллельного зондов. Полученные продукты лигирования детектируют в режиме реального времени или проводят электрофоретический анализ меченых одонитевых фрагментов ДНК [18]. Этот метод также является трудоемким, дорогостоящим и требует значительных затрат времени для подбора расходных материалов.

На основании анализа преимуществ и недостатков приведенных молекулярных технологий в качестве метода исследования генетических факторов предрасположенности к развитию псориаза нами был выбран метод аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени. Метод обеспечивает осуществление идентификации SNP, отличается высокой специфичностью, по сравнению с другими методами позволяет значительно ускорить процедуру анализа полиморфизмов на большой выборке обследуемых.

Материалы и методы

Материалы исследования

Материалом для проведения экспериментальных исследований явились образцы цельной крови, полученные от больных псориазом ($n = 45$) и здоровых добровольцев ($n = 45$). Взятие образцов проводилось в вакуумные системы для забора крови типа Vacuette (BD Vacutainer, Великобритания) объемом 4 мл (пробирки с дозированным отрицательным давлением), в которых содержалась этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — стабилизатор свертывания крови, не ингибирующий ПЦР. До исследования образцы крови хранились в замороженном состоянии в морозильной камере, обеспечивающей постоянное поддержание температуры на уровне $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед началом исследования обеспечивали оттаивание образцов при комнатной температуре в течение 30 минут.

Методология проведения исследования

При разработке методологии проведения исследования для выявления частоты встречаемости SNP у больных псориазом и здоровых лиц был выбран метод аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени.

Исследование проводилось в несколько этапов:

- выделение из образца геномной ДНК и оценка ее качества;
- амплификация фрагментов генов и аллель-специфическая гибридизация мишеней и зондов в формате ПЦР в реальном времени.

Выделение ДНК из образцов крови проводилось с использованием набора реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (Биокот, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. В состав указанного набора входит лизирующий реагент с гуанидинтиоционатом. Из рабочего раствора ДНК сорбировали на сорбенте

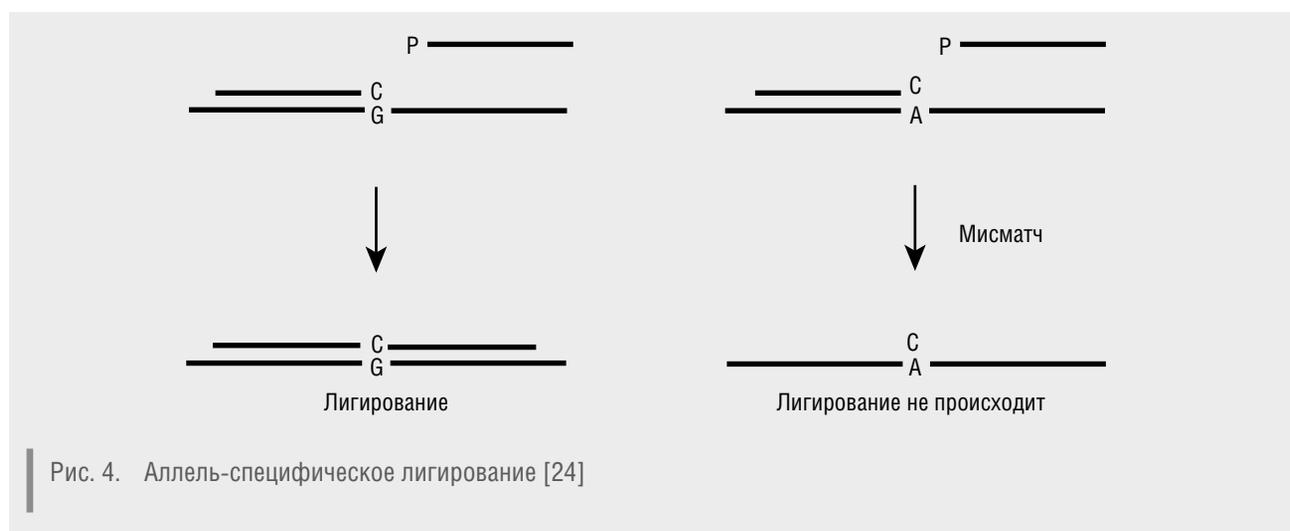


Рис. 4. Аллель-специфическое лигирование [24]

NucleoSTM, затем отмывали от белков и солей спиртовым раствором и элюировали буфером.

Качество ДНК в пробах оценивалось с помощью электрофоретического разделения ДНК в 1% агарозном геле с последующим фотографированием гелей в ультрафиолетовом свете с длиной волны 310 нм с помощью встроенной в трансиллюминатор фотокамерой (Biorad, Германия). Очищенный раствор ДНК объемом 100 мкл помещался в микропробирки типа Eppendorf (Eppendorf, Германия) объемом 1,5 мл и хранился в условиях низкой температуры (-20 °C).

Перед началом исследования с использованием программы *Oligo6* производился подбор праймеров

для амплификации фрагментов генов, включающих изучаемые полиморфизмы, а также подбор специфичных зондов, позволяющих идентифицировать соответствующие генотипы аллели в месте нахождения исследуемых SNP. Температура отжига праймеров и зондов в реакции подбиралась по формуле: $2^*(A+T) + 4^*(G+C)$, где А и Т — количество адениновых и тимидиновых остатков в олигонуклеотиде, а G и C — количество гуаниновых и цитозиновых остатков. Перечень праймеров и зондов представлен в табл. 1.

Амплификация каждого из фрагментов генов проводилась с использованием набора с HS Taq ДНК-полимеразой (Евроген) в соответствии с инструкцией

Таблица 1

Праймеры и зонды для осуществления амплификации фрагментов генов и аллель-специфической гибридизации мишеней (SNP) и зондов в формате ПЦР в реальном времени

Ген	Однонуклеотидные полиморфизмы	Праймеры (для амплификации фрагмента гена)	Зонды (для идентификации полиморфизма гена)
<i>IL4/IL13</i>	rs20541	20541for GTTCTACTCATGTGCTGA 20541rev ATCTGCAACTTCAATAGTC	20541A FAM-CGCGAGGGACAGTTCAAC-BHQ1 20541G Cy5-CGCGAGGGACGTTCAAC-BHQ2
<i>IL-28RA</i>	rs4649203	4649203for GCCTCTCTGGGTAGAAT 4649203rev CCAGGATGTTGAAGAGG	4649203G FAM-GCTGGGTTGCAGAGGAGG-BHQ1 4649203A Cy5-GCTGGATTGCAGAGGAGG-BHQ2
<i>NFKBI</i>	rs8016947	8016947for TGAGAAATCCTGCCACAT 8016947rev TGAGAGTTGGCTTCTCTAA	8016947T FAM-GCAAACCTTGATTCTCCAGC-BHQ1 8016947G Cy5-GCAAACCTTGATTCTCCAGC-BHQ2
<i>IL-23R</i>	rs11209026	11209026for CAACAGAGGAGACATTGGA 11209026rev GGCATGGGTAAGTACTTATT	11209026G FAM-GATCATCCGAACTGGGTAG-BHQ1 11209026A Cy5-GATCATCCGAACTGGGTAG-BHQ2
<i>TNFAIP3</i>	rs610604	610604for GGATGGACCAAGATTGATTA 610604rev CATCATTAGCTCATAGAACA	610604G FAM-GAAAAGTGTGAGCTTCTCACC-BHQ1 610604T Cy5-GAAAAGTGTGAGCTTCTCACC-BHQ2
<i>SERPINB8</i>	rs514315	514315for ACATAGAAGTAGAATGGCT 514315rev GCTGAACATAATTAGGCAT	514315T Cy5-GGTTTTTCTCTCTTCTCACC-BHQ2 514315C FAM-GGTTTTTCTCTCTTCTCACC-BHQ1
<i>ZNF816A</i>	rs9304742	9304742for CCAAGTGTCTAGGATTACA 9304742rev TATCTGGAGAGTTGGACAT	9304742 FAM-CCAACCAATGTGTTCTGTAACA-BHQ1 9304742 Cy5-CCAACCAATGCGTTCGTAACA-BHQ2
<i>HLA-C</i>	rs10484554	10484554for GACTTAACATCAAGTTCT 10484554rev GGTTGAGTTAACTCTGTT	10484554 FAM-TCCTATCTCACCTATGACGTC -BHQ1 10484554 Cy5-TCCTATCTCACCTATGACGTC-BHQ2
<i>MIF</i>	rs755622	755622for TGACTTAGTGAAGGACTA 755622rev AGTGGGGAAGTCACCGC	755622 FAM-GAGAACAGGTTGGAGCGGT-BHQ1 755622 Cy5-GAGAACAGCTTGGAGCGGT-BHQ2
<i>TNIP1</i>	rs17728338	17728338for TCATTAAGTGTAAACTGCAT 17728338rev CTATGCTCTGAGGACAAAT	17728338 FAM-TTAGTAGGACCGTTGCCAAAAG-BHQ1 17728338 Cy5-TTAGTAGGACCATGCAAAG-BHQ2
<i>TYK2</i>	rs12720356	12720356for TTTCAACCCAGACCAACT 12720356rev CACCATCTTCCAAGCCAT	12720356 FAM-TTACAGATATCATGGTGACAGA-BHQ1 12720356 Cy5-TTACAGATAGCATGGTGACAGA-BHQ2
<i>TRAF3IP2</i>	rs13190932	13190932for GAGGAATCAGAACACC 13190932rev TCCAGAACTTGAGTGCG	13190932C FAM-AATCACCAGCGGCTGTAT-BHQ1 13190932T Cy5-AATCACCAGTGCGCTGTAT-BHQ2
<i>IL-23A</i>	rs2066808	2066808for CTAGTTCCAGCTCTAATGA 2066808rev TCAGAAAAGTTAGGCCACT	2066808 FAM-CAAATGAAATCAGGAATGGTGA-BHQ1 2066808 Cy5-CAAATGAAATCAGGAATGGTGA-BHQ2
<i>ZNF313</i>	rs2235617	2235617for AACATTTGTA AAAAGGCTAG 2235617rev TATAAAAATCCAATGCCCA	2235617 FAM-GACTGCTTTCTCCTGTGCCT-BHQ1 2235617 Cy5-GACTGCTTTCTCCTGTGCCT-BHQ2
<i>IL-28RA</i>	rs4649203	4649203for GCCTCTCTGGGTAGAAT 4649203rev CCAGGATGTTGAAGAGG	4649203G FAM-GCTGGGTTGCAGAGGAGG-BHQ1 4649203A Cy5-GCTGGATTGCAGAGGAGG-BHQ2
<i>ERAP1</i>	rs27524	27524 for CCTAGCATATGCATATATAA 27524rev GATGATAATGGACAGGTAAA	27524 FAM-CCTTTACAATAGCATAAAAACATAC-BHQ1 27524 Cy5-CCTTTACAGTAGCATAAAAACATAC-BHQ2
<i>REL</i>	rs702873	702873for ATTAGGAAGATTAGTGGTGT 702873rev CTAATAAGTCAAGGACCTA	702873FAM-TAGATGATGCGTACGCTACC-BHQ1 702873 Cy5-TAGATGATGCGTACGCTACC-BHQ2
<i>IL-12B</i>	rs3213094	3213094rev AAGGCAGATACTGTTATTAT 3213094for AGCACAAATTCAGTTTCATA	3213094 FAM-CGAGAACAACGAACCAAGAC-BHQ1 3213094 Cy5-CGAGAACAATGAACCAAGAC-BHQ2

производителя с добавлением праймеров по 20 пмоль каждого, зондов по 10 пмоль и 200 нг ДНК человека, в формате 96-луночного планшета. ПЦР фрагментов всех генов проводилась в режиме реального времени при разных условиях (табл. 2). При амплификации гена *ERAP1* температура отжига составляла 54 °С, генов *IL-23A*, *SERPINB8*, *TRAF3IP2* и *IL-23R* — 56 °С, генов *TNFAIP3* и *TNIP1* — 58 °С, гена *REL* — 60 °С и генов *IL-28RA*, *ZNF816A* и *ZNF312* — 62 °С.

Считывание сигнала флуоресценции с каналов детекции FAM и Cy5 производили на стадии отжига праймеров (54 °С—62 °С); при этом программное обеспечение прибора представляло первичные данные в виде диаграммы распределения аллелей. О наличии в пробе одного или другого аллеля судили по отношению уровней флуоресценции от обоих зондов. Программное обеспечение представляло результаты генотипирования в виде распределения аллелей. Аллели, меченные флуорофором Cy5, обозначались зеленым цветом, аллели, меченные флуорофором FAM, — синим цветом, красным цветом обозначалась комбинация двух аллелей. На рисунке 5 представлено распределение аллелей гена *TNFAIP3* (полиморфизм rs610604) у больных псориазом и здоровых добровольцев.

Два SNP (полиморфизм rs8016947 в гене *NFKB1* и полиморфизм rs12720356 в гене *TYK2*) методом аллель-специфической гибридизации идентифицировать не удалось. Данное обстоятельство могло быть обусловлено сложной структурой нуклеотидной последовательности ДНК, окружающей данные SNP-маркеры, в связи с чем подобранные зонды работали неэффективно. Поэтому для изучения полиморфизма rs8016947 в гене *NFKB1* и полиморфизма rs12720356 в гене *TYK2* был применен метод анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Данные полиморфизмы входили в сайты рестрикции эндонуклеаз: Hinf1 (Сибэнзим, Россия) для исследования полиморфизма rs8016947 в гене *NFKB1* и EcoRV (Сибэнзим, Россия) для исследования полиморфизма rs12720356 в гене *TYK2*.

Протокол ПДРФ-анализа включал описанные выше этапы выделения ДНК из биообразцов крови, полученных от больных псориазом и здоровых добровольцев, и проведение методом ПЦР амплификации

фрагментов генов *NFKB1* и *TYK2* с использованием ранее подобранных праймеров и условий проведения реакции.

Дальнейшее исследование проводилось следующим образом.

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР-реакции осуществлялось в 2% агарозном геле. Для приготовления 100 мл 2% агарозного геля 1 г агарозы смешивали с 10 мл 10 × TBE и 90 мл dH₂O. Приготовленную смесь прогревали в СВЧ-печи 5—7 мин. (до полного растворения агарозы), затем в нее добавляли 10 мкл бромистого этидия (1% раствор) и перемешивали. Расплавленную агарозу охлаждали до температуры 50—60 °С и заливали в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов на планшет устанавли-

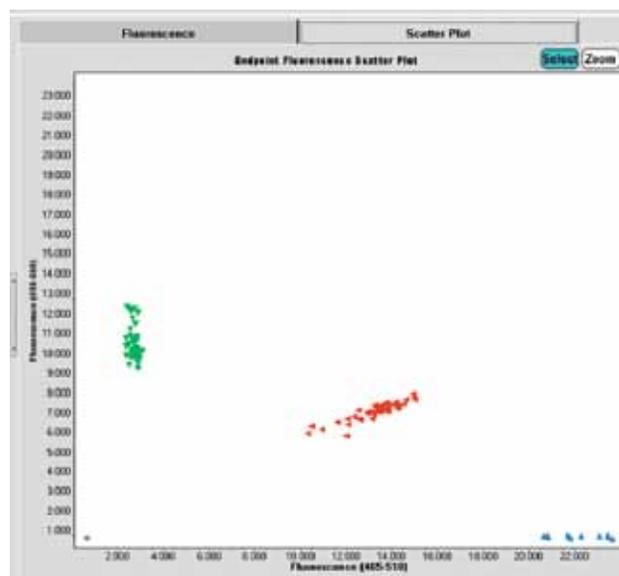


Рис. 5. Диаграмма распределения аллелей гена *TNFAIP3* (полиморфизм rs610604) у больных псориазом и здоровых добровольцев. Гомозиготы *A/A* обозначены треугольниками зеленого цвета, гомозиготы *C/C* — треугольниками синего цвета, гетерозиготы *A/C* — треугольниками красного цвета

Таблица 2 Условия амплификации генов при проведении реакции амплификации

Рекомендованные условия амплификации	Количество циклов амплификации
95 °С — 7 мин.	1 цикл
95 °С — 10 сек. 54—62 °С — 1 мин. 72 °С — 1 сек.	40 циклов

вали гребенки. Раствор агарозы застывал в течение 15—30 мин. при комнатной температуре. Результаты прохождения реакций амплификации оценивали с помощью трансиллюминатора с фотокамерой для фотографирования гелей в ультрафиолетовом свете с длиной волны 310 нм (Biorad, Германия).

Дополнительно для проведения рестрикции продуктов амплификации ДНК использовались рестриктазы:

- рестриктаза Hinf1 (Сибэнзим, Россия) для исследования полиморфизма rs8016947 в гене *NFKB1*;
- рестриктаза EcoRV (Сибэнзим, Россия) для исследования полиморфизма rs12720356 в гене *TYK2*.

Для проведения рестрикции готовили рестриционную смесь, состав компонентов которой в расчете на одну пробирку приведен в табл. 3.

После приготовления смесь компонентов аккуратно перемешивали и центрифугировали на аппарате Vortex (Биосан, Латвия). Затем в каждую микропробирку объемом 0,2 мл вносили 6 мкл приготовленной реакционной смеси для проведения рестрикции и 14 мкл продукта амплификации ДНК соответствующего фрагмента.

Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

Рестрикция продуктов амплификации генов *NFKB1* и *TYK2* проводилась в амплификаторе Dyad (Biorad, Германия). На первой стадии продукты амплификации подвергались обработке при температуре 37 °С в течение 120 мин. для осуществления рестрикции, а затем — обработке при 80 °С в течение 5 мин. для инактивации фермента.

Результаты ПДРФ определялись визуально при анализе агарозного геля (рис. 6, 7) путем определения количества полученных фрагментов ДНК. При анализе полиморфизма rs12720356 в гене *TYK2* полное расщепление ПЦР продукта указывало на гомозиготный генотип *T/T* данного гена; появление трех продуктов рестрикции указывало на гетерозиготный *T/G* генотип данного гена. При анализе полиморфизма rs8016947 в гене *NFKB1* полное расщепление продукта ПЦР указывало генотип *G/G*; появление трех продуктов рестрикции указывало на гетерозиготный *T/G* генотип данного гена, а появление одного продукта позволяло идентифицировать генотип *T/T*.

Таблица 3

Состав реакционной смеси для проведения рестрикции продуктов амплификации генов *NFKB1* и *TYK2*

№	Наименование реагента	Объем, мкл
1	10 x буфер для рестриктазы	2
2	Рестриктаза	1
3	dH ₂ O	3



Рис. 6.

Результаты ПДРФ-анализа фрагмента гена *TYK2*. Дорожка 4 — маркер молекулярных весов 100 b.p (100—1000); дорожки 1, 2 и 3 — результаты рестрикции ДНК фрагмента гена *TYK2* [дорожки 1 и 2 — генотип rs12720356 *T/T* (дикий тип), дорожка 3 — генотип rs12720356 *T/G*]

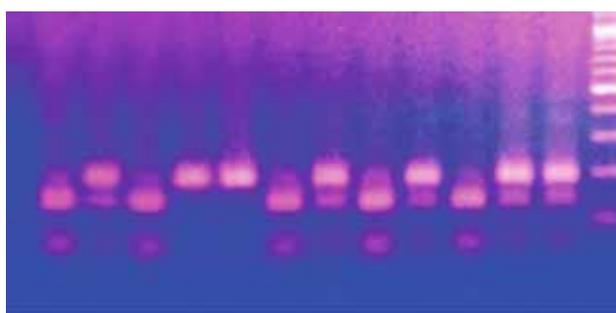


Рис. 7.

Результаты ПДРФ-анализа фрагмента гена *NFKB1*. Дорожка 13 — маркер молекулярных весов 100 b.p (100—1000); дорожки 1—12 — результаты рестрикции ДНК фрагмента гена *NFKB1* [дорожки 4 и 5 — генотип rs8016947 *T/T* (дикий тип), дорожки 2, 7, 9, 11 и 12 — генотип rs8016947 *T/G*, дорожки 1, 3, 6, 8, и 10 — генотип rs8016947 *G/G*]

Результаты исследования

Результаты идентификации 11 полиморфизмов методом аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени

Методом аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени на биоматериалах, полученных от 45 больных псориазом и 45 здоровых добровольцев, были установлены генотипы 11 из 13 изучавшихся маркеров предрасположенности к псориазу; установлена частота их встречаемости у больных псориазом и здоровых (табл. 4).

Так, при изучении полиморфизма rs11209026 в гене *IL-23R* у подавляющего большинства обследованных

был обнаружен генотип *G/G*: у 44 больных псориазом (80%) и у 41 здорового добровольца (74,5%). У 1 больного псориазом (2,2%) и у 2 здоровых (4,4%) был обнаружен генотип *A/G*. Генотип *A/A* у больных псориазом не был выявлен, но был обнаружен у 2 здоровых лиц (4,4%).

В результате изучения методом аллель-специфической гибридизации полиморфизма rs4649203 гена *IL-28RA* у больных псориазом были обнаружены следующие генотипы: генотип *AA* — у 24 пациентов (53,3%), генотип *GG* — у 6 человек (13,3%) и генотип *AG* — у 15 (33,3%). У здоровых лиц данные генотипы встречались с частотой соответственно 57,8% (26/45), 8,9% (4/45) и 33,3% (15/45).

Таблица 4

Частота встречаемости различных генотипов SNP генов *IL-23R*, *IL-28RA*, *NFKBI*, *SERPINB8*, *TRAF3IP2*, *TNFAIP3*, *REL*, *ZNF313*, *IL-12B*, *TYK2*, *TNIP1*, *ZNF816A*, *ERAP1* у больных псориазом ($n = 45$) и здоровых добровольцев ($n=45$)

Группы	Ген/ генотип								
	<i>IL-23R</i> (rs11209026)			<i>IL-28RA</i> (rs4649203)			<i>NFKBI</i> (rs8016947)		
	AA	GG	AG	AA	GG	AG	GG	TT	GT
Больные псориазом	0/45 0	44/45 80%	1/45 2,2%	24/45 53,3%	6/45 13,3%	15/45 33,3%	14/45 31,1%	5/45 11,1%	26/45 57,8%
Контрольная группа	2/45 4,4%	41/45 74,5%	2/45 4,4%	26/45 57,8%	4/45 8,9%	15/45 33,3%	13/45 28,9%	8/45 17,8%	24/45 46,2%
	<i>SERPINB8</i> (rs514315)			<i>TRAF3IP2</i> (rs13190932)			<i>TNFAIP3</i> (rs610604)		
	CC	TT	CT	AA	GG	AG	AA	CC	AC
	Больные псориазом	7/45 15,6%	25/45 55,6%	13/45 28,9%	0/45 0	31/45 68,9%	14/45 31,1%	23/45 51,1%	4/45 8,9%
Контрольная группа	4/45 8,9%	22/45 48,9%	19/45 42,2%	0 0	33/45 73,3%	12/45 26,7%	26/45 57,8%	3/45 6,7%	16/45 35,6%
	<i>REL</i> (rs702873)			<i>ZNF313</i> (rs2235617)			<i>IL-12B</i> (rs3213094)		
	AA	GG	AG	CG	CC	GG	AA	GG	AG
	Больные псориазом	4/45 8,9%	22/45 48,9%	19/45 42,2%	18/45 40,0%	16/45 35,6%	11/45 24,4%	4/45 8,9%	26/45 57,8%
Контрольная группа	9/45 20,0%	16/45 35,6%	21/45 46,7%	20/45 44,4%	14/45 31,1%	11/45 24,4%	2/45 4,4%	25/45 55,6%	18/45 40,0%
	<i>TYK2</i> (rs1272035)			<i>TNIP1</i> (rs17728338)			<i>ZNF816A</i> (rs9304742)		
	TT	TG	—	GG	AG	AA	CC	CT	TT
	Больные псориазом	*43/45 95,6%	*2/45 4,4%	—	32/45 71,1%	13/45 28,9%	0/45 0	4/45 8,9%	17/45 37,8%
Контрольная группа	35/45 77,8%	10/45 22,2%	—	40/45 88,9%	15/45 33,3%	0	6/45 13,3%	19/45 42,2%	20/45 44,4%
	<i>ERAP1</i> (rs27524)								
	GG	AG	AA						
	Больные псориазом	18/45 40,0%	25/45 55,6%	2/45 4,4%					
Контрольная группа	19/45 42,2%	21/45 46,7%	5/45 11,1%						

Примечание: * Отличия между больными псориазом и здоровыми достоверны.

Полиморфизм rs514315 гена *SERPINB8* характеризовался следующими вариантами: наиболее часто встречался генотип *T/T* (у 25 больных псориазом (55,6%) и у 22 здоровых (48,9%)); гетерозиготный генотип *C/T* был зарегистрирован у 13 больных псориазом (28,9%) и 19 здоровых добровольцев (42,2%); гомозиготный генотип *C/C* был отмечен у 7 больных псориазом (15,6%) и 4 здоровых (8,9%).

При изучении полиморфизма rs13190932 гена *TRAF3IP2* были выявлены генотипы *A/G* и *G/G*. Наиболее часто встречался генотип *G/G*: его частота у больных псориазом составила 68,9% (у 31 из 45 человек), у здоровых — 73,3% (у 33 из 45 человек). Вторым по частоте выявления был гетерозиготный генотип *A/G*: частота данного генотипа у больных псориазом составила 31,1% (у 14 из 45 человек), у здоровых соответственно 26,7% (у 12 из 45 человек).

Полиморфизм rs610604 гена *TNFAIP3* характеризовался следующими вариантами: *A/A*, *C/C* и *A/C*. Наиболее часто регистрировался генотип *A/A*: его частота у больных псориазом составила 51,1% (у 23 из 45 человек), у здоровых 57,8% (у 26 из 45 человек). Вторым по частоте встречаемости был генотип *A/C*, который регистрировался у 18 из 45 больных псориазом (40,0%) и у 16 из 45 здоровых (35,6%).

При изучении полиморфизма rs702873 гена *REL* в выборке обследованных были выявлены генотипы *A/A*, *G/G* и *A/G*. При этом с близкой частотой, как у больных псориазом, так и у здоровых, встречались генотипы *G/G* и *A/G*: генотип *G/G* был зарегистрирован у 22 больных псориазом (48,9%) и у 16 здоровых лиц (35,6%); генотип *A/G* встречался у 19 больных псориазом (42,2%) и у 21 здорового добровольца (46,7%). Наиболее редким в выборке был генотип *A/A*, который был установлен у 4 больных псориазом (8,9%) и у 9 здоровых лиц (20,0%).

При изучении полиморфизма rs2235617 в гене *ZNF313* было установлено 3 варианта генотипов: *C/C*, *G/G* и *C/G*. При этом у больных псориазом и здоровых лиц генотипы встречались с близкой частотой: *C/G* — у 18 больных псориазом (40,0%) и у 20 здоровых (44,4%); *C/C* — у 16 больных псориазом (35,6%) и у 14 здоровых (31,1%); генотип *G/G* — у 11 больных псориазом и у 11 здоровых (24,4%).

Полиморфизм rs3213094 в гене *IL-12B* характеризовался следующими вариантами: *A/A*, *G/G* и *A/G*. Наиболее часто регистрировался генотип *G/G*, который был зарегистрирован у 26 больных псориазом (57,8%) и у 25 здоровых добровольцев (55,6%). На втором месте по частоте регистрации у обследованных был гетерозиготный генотип *A/G*, который встречался у 15 больных псориазом (33,3%) и у 18 здоровых лиц (40,0%). Генотип *A/A* был наиболее редким и идентифицировался у 4 больных псориазом (8,9%) и у 2 здоровых добровольцев (4,4%).

В результате изучения полиморфизма rs17728338 в гене *TNIP1* у обследованных были идентифицированы два вида генотипов: *A/G* и *G/G*. Гомозиготный генотип *G/G* встречался у 32 больных псориазом (71,1%) и у 40 здоровых (88,9%); гетерозиготный генотип *A/G* был зарегистрирован у 13 больных псориазом (28,9%) и у 15 здоровых лиц (33,3%).

Полиморфизм rs9304742 гена *ZNF816A* характеризовался наличием трех генотипов: *C/C*, *C/T* и *T/T*; при этом как у больных псориазом, так и у здоровых данные генотипы встречались с близкой частотой. Так, генотип *C/C* был зарегистрирован у 4 больных (8,9%) и у 6 здоровых (13,3%); генотип *C/T* регистрировался у 17 больных псориазом (37,8%) и у 19 здоровых (42,2%); генотип *T/T* встречался наиболее часто и был отмечен у 24 больных псориазом (53,3%) и у 20 здоровых (44,4%).

В результате изучения полиморфизма rs27524 гена *ERAP1* были идентифицированы генотипы *A/A*, *G/G*, *A/G*; при этом наиболее частым в выборке обследованных был гетерозиготный генотип *A/G*, который встречался у 25 больных псориазом (55,6%) и у 21 здорового добровольца (46,7%). На втором месте по частоте регистрации был гомозиготный генотип *G/G*; данный генотип был зарегистрирован у 18 больных псориазом (40,0%) и у 19 здоровых добровольцев (42,2%). Генотип *A/A* был зарегистрирован у 2 больных псориазом (4,4%) и у 5 здоровых добровольцев (11,1%).

Результаты идентификации двух полиморфизмов (rs8016947 и rs12720356) методом ПДРФ

В результате проведения ПДРФ-анализа в обследованной выборке пациентов были идентифицированы 2 полиморфизма: полиморфизм rs1272035 в гене *TYK2* и полиморфизм rs8016947 в гене *NFKBI*.

Полиморфизм rs1272035 в гене *TYK2* характеризовался наличием двух генотипов: гомозиготного генотипа *T/T* и гетерозиготного генотипа *T/G*. Гомозиготный генотип *T/T* встречался у 43 больных псориазом (95,6%) и у 35 здоровых лиц (77,8%). Гетерозиготный генотип *T/G* был зарегистрирован у 2 больных псориазом (4,4%) и у 10 здоровых (22,2%).

Полиморфизм rs8016947 в гене *NFKBI* был отмечен тремя генотипами: гомозиготными *G/G* и *T/T* и гетерозиготным — *G/T*. Генотип *G/T* в выборке обследованных встречался наиболее часто: у 26 больных псориазом (57,8%) и у 24 здоровых лиц (46,2%). Генотип *G/G* был вторым по частоте регистрации в выборке и обнаруживался у 14 больных псориазом (31,1%) и у 13 здоровых (28,9%). Генотип *T/T* был наиболее редким и выявлялся у 5 больных псориазом (11,1%) и у 8 здоровых (17,8%).

Достоверных отличий между частотой встречаемости отдельных генотипов между больными псориазом и здоровыми на данном этапе исследования выявлено не было, что может быть объяснено относительно малочисленностью выборки. Исключение составил ген *TYK2*: rs1272035. Гомозиготный ге-

нотип *T/T* значительно чаще встречался у больных псориазом (95,6%) в сравнении со здоровыми лицами (77,8%) (OR = 6.1 ± 4.9; $\chi^2 = 6,0$; $p = 0,01$), что позволяет рассматривать носителей данного генотипа как лиц с повышенной предрасположенностью к развитию псориаза, а сам генотип *TYK2-T/G* — как фактор риска в отношении развития псориаза. Напротив, гетерозиготный генотип *T/G* значительно чаще встречался у здоровых (22,2%) в сравнении с больными псориазом (4,4%) (OR = 0,16 ± 0,13; $\chi^2 = 6,1$; $p = 0,01$).

Заключение

Несмотря на множество разработанных и внедренных в последние годы методов генотипирования SNP, универсального метода для определения различных генетических маркеров заболевания не существует.

С целью проведения генотипирования маркеров предрасположенности к развитию псориаза нами был выбран метод аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени, обладающий преимуществами в сравнении с другими молекулярными методами, применяемыми для идентификации SNP: высокой специфичностью реакции за счет использования гибридизационных зондов, снижением риска контаминации за счет исключения постаmplификационных манипуляций с продуктом амплификации, экономией времени и сокращением материальных затрат на выполнение исследований, возможностью автоматизации и стандартизации ПЦР в реальном времени.

В результате применения метода аллель-специфической гибридизации в формате ПЦР в реальном времени у обследованных лиц (45 больных псориазом и 45 здоровых добровольцев) были установлены генотипы 11 из 13 изучавшихся маркеров предрасположенности к псориазу, описанных в зарубежной литературе как маркеры заболевания; установлена частота их встречаемости у больных псориазом и здоровых: (rs4649203 (ген *IL-28RA*), rs11209026 (ген *IL-23R*), rs610604 (ген *TNFAIP3*), rs514315 (ген *SERPINB8*), rs9304742 (ген *ZNF816A*), rs17728338 (ген *TNIP1*), rs13190932 (ген *TRAF3IP2*), rs2235617 (ген *ZNF313*),

rs27524 (ген *ERAP1*), rs702873 (ген *REL*), rs3213094 (ген *IL-12B*). rs9304742.

Генотип двух SNP (rs12720356 (ген *TYK2*), rs8016947 (ген *NFKBI*)) методом аллель-специфической гибридизации установить не удалось, что могло быть обусловлено сложной структурой нуклеотидной последовательности ДНК, окружающей данные SNP-маркеры, в связи с чем подобранные зонды работали неэффективно. Для изучения полиморфизмов фрагментов генов rs12720356 (ген *TYK2*), rs8016947 (ген *NFKBI*) протокол исследования был изменен: для изучения данных полиморфизмов был применен ПДРФ-анализ, обладающий высокой точностью, воспроизводимостью, не требующий подбора аллель-специфических зондов и применения дорогостоящего оборудования.

В результате проведенных работ впервые на российской выборке пациентов был получен массив экспериментальных данных о структуре и частоте встречаемости генотипов в соответствующих позициях 13 генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию псориаза. Полученные результаты подлежат подробному статистическому анализу на дальнейших этапах исследования при увеличении выборки больных псориазом не менее чем до 500 человек и выборки здоровых — не менее чем до 150 человек.

На настоящем этапе исследования достоверных отличий между частотой встречаемости отдельных генотипов между больными псориазом и здоровыми выявлено не было, что может быть объяснено относительной малочисленностью выборки. Исключение составил ген *TYK2*: rs1272035. Гомозиготный генотип *T/T* значительно чаще встречался у больных псориазом (95,6%) в сравнении со здоровыми лицами (77,8%) (OR = 6.1 ± 4.9; $\chi^2 = 6,0$; $p = 0,01$), что позволяет рассматривать носителей данного генотипа как лиц с повышенной предрасположенностью к развитию псориаза, а сам генотип *TYK2-T/G* — как фактор риска в отношении развития псориаза. Напротив, гетерозиготный генотип *T/G* значительно чаще встречался у здоровых (22,2%) в сравнении с больными псориазом (4,4%) (OR = 0,16 ± 0,13; $\chi^2 = 6,1$; $p = 0,01$). ■

Литература

- Nestle F.O., Kaplan D.H., Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; 361: 496—509.
- Elder J.T., Bruce A.T., Gudjonsson J.E. et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1213—1226.
- Fedorov S.M. Psoriasis: klinicheskie i terapevticheskie aspekty. *Rus. Med. Zhurn.* 2001; 9 (11): 447—451. [Федоров С.М. Псориаз: клинические и терапевтические аспекты. *Рус. Мед. Журн.* 2001; 9 (11): 447—451].
- Znamenskaya L.F., Melekhina L.E., Bogdanova E.V., Mineeva A.A. Zaboolevaemost' i rasprostranennost' psoriaza v Rossiyskoy Federatsii. *Vestn Dermatol Venerol* 2012; 5: 20—29. [Знаменская Л.Ф., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В., Минеева А.А. Заболеваемость и распространенность псориаза в Российской Федерации. *Вестн дерматол. и венерол.* 2012; 5: 20—29.]
- Gelfand J.M., Weinstein R., Porter S.B. et al. Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch Dermatol* 2005; 141 (12): 1537—1541.
- Griffiths C.E., Barker J.N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370 (9583): 263—271.
- База данных Национального института здоровья США. <http://www.genome.gov/gwastudies>.
- Michailidis C., Karpouzis A., Kourmouli N. Notch2, notch4 gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 2013; 23 (2): 146—153.
- Brookes, A.J. 1999. The essence of SNP. *Gene* 234: 177—186.

10. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Cold Spring Harbor, New York 11724, USA.
11. Khayrutdinov V.R., Ponomarev I.A., Zhukov A.S. i dr. Novaya genetičeskaya determinanta psoriaza — Ile479Leu polimorfizm gena kaspazy-10. *Vestn Dermatol Venerol* 2009; 1: 12—14. [Хайрутдинов В.Р., Пономарев И.А., Жуков А.С. и др. Новая генетическая детерминанта псориаза — Ile479Leu полиморфизм гена каспазы-10. *Вестн дерматол и венерол* 2009; 1: 12—14.]
12. Baranov V.S. Polimorfizm genov, ekogenetičeskie bolezni i prediktivnaya personalizirovannaya meditsina. *Ekologičeskaya genetika*. 2011; 9 (3): 3—14. [Баранов В.С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и предиктивная персонализированная медицина. *Экологическая генетика*. 2011; 9 (3): 3—14.]
13. Kaganova N.L., Frigo N.V., Znamenskaya L.F. i dr. Vozmožnost' prognozirovaniya kliničeskogo otveta na lečenie bol'nykh psoriazom. *Vestn Dermatol Venerol* 2009; 4: 20—26. [Каганова Н.Л., Фриго Н.В., Знаменская Л.Ф. и др. Возможность прогнозирования клинического ответа на лечение больных псориазом. *Вестн дерматол и венерол* 2009; 4: 20—26.]
14. Terman O.A., Shul'man A.Ya., Kukhareva E.N. Polimorfizm RAGE-gena u bol'nykh psoriazom. *Vestn Dermatol Venerol* 2006; 5: 62—65. [Терман О.А., Шульман А.Я., Кухарева Е.Н. Полиморфизм RAGE-гена у больных псориазом. *Вестн дерматол и венерол* 2006; 5: 62—65.]
15. Kwok P-Y. Methods for genotyping singlenucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001 (2): 235—258.
16. Friedman K.J., Highsmith W.E., Jr., Prior T.W. et al. Cystic fibrosis deletion mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1990; 36: 695—696.
17. Kalinina O., Lebedeva I., Brown J. et al. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1999—2004.
18. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 189—193.
19. Kofiadi I.A., Rebrikov D.V. Metody detektsii odnonukleotidnykh polimorfizmov: allel'-spetsifičnyy PFSR i gibrizatsiya s oligonukleotidnoy proboy. *Genetika* 2007; 26: 22—32. [Кюфиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции одноклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичный ПФСР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика* 2007; 26: 22—32.]
20. Happich D., Madlener K., Schwaab R. et al. Application of the TaqMan-PCR for genotyping of the prothrombin G20210A mutation and of the thermolabile methyltetrahydrofolate reductase mutation. *Thromb Haemost* 2000; 84 (1): 144—145.
21. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 (16): 7276—7280.
22. Bouakaze C., Keyser C., De Martino S.J. et al. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (5): 1758—1766. Sankowski A.J., Lebkowska U.M., Ćwikła J. Psoriatic arthritis. *Pol J Radiol*. 2013 Jan-Mar; 78(1): 7—17.
23. Choi S.Y., Lee K.Y., Kim Y.E. et al. Application of allele-specific primer extension-based microarray for simultaneous multi-gene mutation screening in patients with non-syndromic hearing loss. *Int J Mol Med* 2010; 25(3): 315—320.
24. *Kliničeskaya biokhimiya: učebnoe posobie*. 3-e izdanie / pod red. V.A. Tkachuka. M.: GEOTAR-Media, 2008. [Клиническая биохимия: учебное пособие. 3-е издание / под ред. В.А. Ткачука. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.]
25. Cooper D.N., Schmidtke J. DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 1984; 66 (1): 1—16.
26. Eiken H.G., Odland E., Boman H. et al. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 (7): 1427—1430.
27. Mineeva A.A., Kozhushnaya O.S., Volnukhin V.A. i dr. Izučenie genetičeskikh faktorov predispozitsionnosti k razvitiyu psoriaza. *Vestn Dermatol Venerol* 2012; 3: 30—38. [Минеева А.А., Кожушная О.С., Волнухин В.А. и др. Изучение генетических факторов предрасположенности к развитию псориаза. *Вестн дерматол и венерол* 2012; 3: 30—38.]
28. Borodina T. Metody detektsii SNP Institut Biologii Gena. [Бородина Т. «Методы детекции SNP» Институт Биологии Гена]. http://molbiol.edu.ru/review/04_03.html.

об авторах:

А.А. Минеева — м.н.с. отдела дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

О.С. Кожушная — м.н.с. отделения молекулярных методов диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Л.Ф. Знаменская — к.м.н., зав. отделом дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

В.В. Чикин — к.м.н., ст.н.с. отдела дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., зам. директора по научно-образовательной работе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва