

ЗУЕВА М.И.<sup>1</sup>, ПАРФЁНОВА Д.О.<sup>2</sup>, АТРАМЕНТОВА Л.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»  
Украина, 61057, Харьков, ул. Чернышевская, 7/9

<sup>2</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

Украина, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: atramentova@yandex.ru, gakkerell@gmail.com

## ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ И ИНСЕРЦИОННО-ДЕЛЕЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА FLG ЧЕЛОВЕКА ПРИ КОЖНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Ген FLG человека, интенсивно изучаемый в связи с кожными болезнями, локализован на длинном плече первой хромосомы (1q21.3) [9]. Ген включает три экзона и кодирует профилагрин – белок-предшественник филагрина (FLG – филамент-агрегирующий белок). Профилагрин входит в состав кератогиалиновых гранул кератиноцитов в гранулярном слое эпителия и выполняет одну из ключевых функций в дифференцировке кератиноцитов и превращении их в ороговевшие чешуйки. Профилагрин разрезается протеазами на мономеры филагрина, которые связываются с цитоскелетом кератиноцитов и участвуют в формировании кожного барьера. Распадаясь на гидрофильные аминокислоты, филагрин участвует в поддержании водного баланса кожи [9]. Мутации с потерей функции гена FLG, терминируя экспрессию профилагрина, ослабляют барьерную функцию кожи, делают её

более чувствительной к неблагоприятным факторам среды и подверженной ихтиозу, экземе, атопическому дерматиту и другим аллергодерматозам [9]. Наиболее изученные мутации гена FLG – 2282del4 и R501X связаны с третьим экзоном. Мутация 2282del4 представляет собой четырёхнуклеотидную делецию, сдвигающую рамку считывания. Мутация R501X (транзиция 1501C/T) приводит к появлению стоп-кодона [9, 14]. В разных популяциях эти мутации проявляют неодинаковую ассоциацию с кожными заболеваниями [14], что вообще характерно для заболеваний мультифакториальной природы.

Цель данной статьи – изложить результаты поиска ассоциаций однонуклеотидного (R501X) и инсерционно-делеционного (2282del4) полиморфизма гена FLG с дерматозами, распространёнными в Харьковской области.

### Объекты и методы исследования.

В исследовании приняли участие 610 жителей Харькова и Харьковской области. Все обследованные (332 женщины и 278 мужчин) украинцы и русские. Это больные в возрасте 16–84 лет, находившиеся на лечении в ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины» (ИДВ). Среди них 51 больной атопическим дерматитом, 45 больных истинной экземой, 47 больных микробной экземой, 171 больной псориазом, 37 больных псориазическим артритом, 91 больной ограниченной склеродермией, 37 больных хронической красной волчанкой, 35 больных микозом стоп и ониомикозом. Контрольную группу составили 96 человек в возрасте 16–80 лет. Образцы их крови собраны в Харьковском областном центре службы крови. ДНК выделена фенольным методом из лейкоцитов периферической крови [3]. ПЦР двух фрагментов гена FLG [7] проведена на амплификаторе «Терцик» (Россия) при объёме амплификационной смеси 30 мкл. Ампликон FLG с мутацией R501X имеет длину 312 п.н., длина ампликона с мутацией с мутацией 2282del4 составляет 811 п.н. Продукты амплификации определены по

данным электрофореза в 1 % агарозном геле. Ампликон FLG R501X обработан рестриктазой Hin1III (NlaIII), ампликон FLG 2282del4 – рестриктазой AdeI (DraIII) (Fermentas, Литва). Рестрикция проведена при 37°C в течение ночи. Для определения молекулярной массы фрагментов ДНК использованы стандартные маркёры молекулярного веса (100–1500 п.н.). Генотипы определены по результатам электрофореза продуктов рестрикции в 3 % агарозном геле. Частоты аллелей в сравниваемых группах рассчитаны по данным о числе генотипов. Частоты мутаций в населении вычислены методом среднего взвешенного [2] с использованием данных о распространённости дерматозов в Харьковской области, полученных в статистическом отделе ИДВ. Гипотезы о равенстве распределений генотипов и аллелей в сравниваемых группах проверены с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йейтса. Сравнение долей выполнено с помощью ф-трансформации и критерия F. Рассчитано отношение шансов OR (odds ratio) с 95%-ным доверительным интервалом [5]. Проверка статистических гипотез проведена на уровне значимости

0,05 с поправкой Бонферрони [1]. Рассчитаны показатели чувствительности, специфичности,

прогностической ценности положительного и отрицательного результата [6].

### Результаты и обсуждение.

У изученного населения частоты мутаций гена FLG (pR501X = 0,010, p2282del4 = 0,005) сопоставимы с данными для европейцев и американцев европейского происхождения (табл. 1). Это сходство может указывать на аналогии в системе генетической подверженности исследованных дерматозов, что даёт возможность использовать в прогностической медицине показатели, полученные на популяциях с похожим ге-

нофондом и условиями среды. Пока нет объяснения, почему мутации R501X и 2282del4 больше распространены в европейских популяциях, а не в азиатских. Выдвигаемые гипотезы [9] базируются на климато-географических особенностях регионов и дифференциальной адаптивной ценности генотипов, но доказательства этого ещё не получены.

Таблица 1. Частоты мутаций R501X и 2282del4 гена FLG

Этническая группа	n	p <sub>R501X</sub>	p <sub>2282del4</sub>
Белые американцы [11]	157	0,013	0,016
Афроамериканцы [11]	447	0,012	0,023
Ирландцы [8]	736	0,013	0,013
Шотландцы [12]	1008	0,030	0,019
Британцы [15]	1463	0,029	0,017
Французы [4]	102	0,025	0,010
Немцы [10]	319	0,008	0,017
Итальянцы [13]	210	<0,001	0,000
Индийцы [7]	111	<0,001	0,014
Японцы [16]	156	<0,001	<0,001
Китайцы [7]	49	<0,001	<0,001
Североафриканцы [7]	124	<0,001	<0,001

Примечания. n – количество обследованных, p – частота аллеля.

В исследованных нами выборках каждая мутация в большинстве случаев была в гетерозиготном состоянии. Носителем мутации R501X были два здоровых человека (2,1 %), три больных псориазом (1,8 %), три больных истинной экземой (6,7 %), два больных микробной экземой (4,3%), два больных atopическим дерматитом (3,9 %) и два больных с микозами и ониомикозами (5,7 %). Мутация 2282del4 обнаружена у одного здорового (1 %), 13 больных atopическим дерматитом (25,5 %), девяти больных истинной (20 %) и шести больных микробной экземой (12,8 %). У единственного гомозиготного носителя мутации 2282del4 – мужчины 45 лет atopический дерматит имел самые тяжёлые проявления.

Показатель OR свидетельствует, что унаследование делеции FLG 2282del4 повышает вероятность заболевания atopическим дерматитом и экземой в десятки раз по сравнению со среднепопуляционным значением (табл. 2). Генетические специфичности, ассоциированные с заболеваниями, могут рассматриваться в качестве маркёров соответствующей наследственной

предрасположенности и использоваться в прогностической медицине. Расчёты показали, что использование делеции как маркёра наследственной предрасположенности к изученным кожным заболеваниям имеет низкую чувствительность, выявляя только 13–23 % людей с наследственной предрасположенностью (табл. 2). Невысокая чувствительность метода объясняется тем, что все представленные в данной работе дерматозы относятся к мультифакториальным заболеваниям и зависят от множества генетических и средовых факторов. Об этом, в частности, свидетельствует особенно низкая чувствительность метода в отношении микробной экземы (13 %). Метод высоко специфичен: отсутствие мутации указывает на принадлежность к группе пониженного риска с вероятностью 99 %. Низкая чувствительность метода не оправдывает его использование в скрининговых программах. В то же он может быть полезными при индивидуальном генетическом консультировании. При наличии мутации FLG 2282del4 с вероятностью около 90 % индивид входит в группу повышенного риска, а при её отсутствии

с уверенностью 70 % можно заявлять об отсутствии у него наследственной предрасположенности к кожным заболеваниям (табл. 2).

Таблица 2. Генетико-прогностическое значение мутаций FLG R501X и 2282del4 для статистически значимых ассоциаций

Группа, заболевание	n	$p_{R501X}$	$p_{2282del4}$	OR <small>2282del4</small>	Чув. <small>2282del4</small>	Спец. <small>2282del4</small>	Прог. ценность	
							пол.	отр.
Контроль	96	0,010	0,005					
Атопич. дерматит	51	0,019	0,127*	32,5	23,5	99,0	92,3	70,9
Истинная экзема	45	0,033	0,100*	23,8	20,0	99,0	90,0	72,5
Микробная экзема	47	0,021	0,063*	13,9	12,8	99,0	85,7	69,8
Псориаз	171	0,008	0,003					
Псориатич. артрит	37	0,000	0,000					
Склеродермия	91	0,000	0,000					
Красная волчанка	37	0,000	0,000					
Микоз и онихомикоз	35	0,029	0,000					

Примечания: n – количество обследованных, p – частоты мутантных аллелей, OR – отношение шансов,

\* – отличие от контроля  $p < 0,05$ , Чув. – чувствительность в %, Спец. – специфичность в %, Прог. ценность – прогностическая ценность в %, пол. – положительный результат, отр. – отрицательный результат.

### Выводы

Мутация с потерей функции 2282del4 гена FLG повышает риск аллергодерматозов у славянского населения Харьковской области. Гомозиготное носительство этой делеции сопровождается особенно тяжёлым течением заболева-

ния. Тестирование на носительство 2282del4 не целесообразно при скрининге, но оправдано для индивидуального генетического прогнозирования на предрасположенность к аллергодерматозам.

### Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы геной инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
4. Hubiche T. et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort // Act. Derm. Venerol. – 2007. – Vol. 87, №6. – P. 499–505.
5. Armitage P., Berry G. Statistical Methods in Medical Research. – 3rd ed. Blackwell Scientific Publications. London, 1994. – 620 p.
6. Banerjee A. Medical Statistics Made Clear: An Introduction to Basic Concepts / London: Royal Society of Medicine Press, 2003. – 137 p.
7. Palmer C.N., Irvine A.D., Terron-Kwiatkowski A., Zhao Y. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis // Nat. Genet. – 2006. – Vol 38, №2. – P. 441–446.
8. Sandilands A. et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema // Nat Genet. – 2007. – Vol. 39. – P. 650–654.
9. Sandilands A., Sutherland C., Irvine A.D., McLean W.H. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease // J Cell Sci., 2009. – Vol. 122, №9. – P. 1285–1294.
10. Marenholz C. et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march // J. of Allergy and Clinical Immunology. – 2006. – Vol. 118, №4. – P. 866–871.
11. Pei-Song G. et al Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. – Vol. 124, Issue 3. – 2009. – P. 507–513.
12. Palmer C. et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults // J Allergy Clin Immunol. – 2007. – Vol. 120. – P. 64–68.
13. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. Giardina E. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients // Dermatology. – 2008. – Vol. 216. – P. 83–84.
14. Smith F.J.D, Irvine A.D., Terron-Kwiatkowski A. et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris // Nat. Genet., 2006. – Vol. 38, №2. – P. 337–342.
15. Barker J. et al Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood // J. Invest Dermatol. – 2007. – Vol. 127, N3. – P.564–567.

16. Nomura T. et al Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis // J Allergy Clin Immunol. – 2007. – Vol. 119. – P. 434–440.

**ZUEVA M.I.<sup>1</sup>, PARFYONOVA D.O.<sup>2</sup>, ATRAMENTOVA L.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> State Enterprise «Institute of Dermatology and Venereology of the National Academy of Medical Sciences in Ukraine»

Ukraine, 61022, Kharkov, Chernishevskaya str., 7/9

<sup>2</sup> V.N.Karazin Kharkov National University

Ukraine, 61022, Kharkov, Svoboda sq., 4, e-mail: atramentova@yandex.ru, gakkerell@gmail.com

### **SNP AND INSERTION-DELETION POLYMORPHISM OF THE FLG HUMAN GENE FOR SKIN DISEASES**

**Aims.** Mutations in FLG-2282del4 and R501X associated with the third exon variously relate to skin diseases. **Methods.** The detection of mutations was performed by PCR-RFLP. **Results.** The FLG mutation frequency in the Slavic population of the Kharkov region is pR501X = 0,010, p2282del4 = 0,005. Inheritance of FLG 2282del4 deletion increases probability of atopic dermatitis and eczema by ten times. This deletion can be considered as a marker of the appropriate genetic predisposition and used in predictive medicine. The sensitivity is 13–23 % and the specificity is 99 %. Prognostic significance of a positive result is 86–92 %, of negative result is 70–73 %. **Conclusions.** FLG-2282del4 mutation increases the risk of allergic dermatitis and homozygous individuals are exposed to particularly severe course of the disease. Carrier testing this deletion is useful when predicting an individual's genetic predisposition to allergic.

**Key words:** FLG gene, 2282del4, R501X, skin diseases.

**КАРПОВА І.С., ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., РУБАН Т.П., МАЦЕВИЧ Л.Л. ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України*

*Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua*

### **ЛЕКТИН *PHASEOLUS VULGARIS* (РНА) ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ МОДУЛЯТОР ЗАХИСНИХ ТА РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В КЛІТИНІ**

На сучасному етапі з'являється все більше свідчень, що онкологічним та іншим хворобам, асоційованим з мутаціями, можна значною мірою запобігти за допомогою речовин з протекторними та антимутагенними властивостями або факторів (фармакологічних, дієтичних), здатних модулювати ефективність природних захисних та репаративних процесів [1]. Перспективними в цьому відношенні є лектини – мембраноактивні вуглеводзв'язувальні білки, притаманні всім живим системам, де відіграють фундаментальну роль в процесах вуглевод-білкового розпізнавання. Лектини вирізняються широким спектром біологічної дії, і у рослинних та тваринних організмів вони є компонентами захисних систем [2]. Лектинам притаманна структурно-функціональна гетерогенність. Це дозволяє висловити припущення, що ізоформи лектину, які

відрізняються за фізико-хімічними і біологічними характеристиками, можуть здійснювати регуляторну дію шляхом впливу на певні мішені різними (автономними або альтернативними) шляхами.

Раніше [3, 4, 5] для низки лектинів тваринного і рослинного походження було показано модулюючий ефект на експресію гена репаративного ензима Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT). Від рівня активності цього протеїна залежить ефективність хіміотерапії онкологічних захворювань, що визначає актуальність пошуку речовин, здатних регулювати експресію гена MGMT.

Мета роботи полягала в оптимізації умов обробки клітин людини препаратами лектину РНА і його ізоформ для дослідження їх модулюючого впливу на експресію гена MGMT.

#### **Матеріали і методи**

За об'єкт дослідження правили 2 лінії клітин: 4BL – лінія фібробластоподібних клітин, отриманих з периферійної крові здорового доно-

ра; Нер-2 – лінія клітин карциноми епітелію гортані. Клітини вирощували на стандартному ростовому середовищі ДМЕМ з додаванням 10 %