

©¹Федота А.М., ²Рощенюк Л.В., ²Воронцов В.М., ³Солодянкин А.С., ^{1,4}Садовниченко Ю.А., ^{1,5}Гонтарь Ю.В.

УДК 616.5-003.871 + 575.224.232.52

¹Федота А.М., ²Рощенюк Л.В., ²Воронцов В.М., ³Солодянкин А.С.,
^{1,4}Садовниченко Ю.А., ^{1,5}Гонтарь Ю.В.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *FLG* У БОЛЬНЫХ ИХТИОЗОМ ПРОСТЫМ

¹Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

²Областной клинический кожно-венерологический диспансер № 1, г. Харьков

ФНЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

⁴Харьковский национальный медицинский университет

⁵ООО «Медицинский центр ИГР», г. Киев

Ихтиоз представляет собой этиологически и клинически гетерогенную группу генодерматозов, характеризующихся нарушением ороговения и образованием чешуек на коже. Наиболее частой формой является ихтиоз простой, аутосомно-доминантный, с неполной пенетрантностью, обусловленный мутациями в гене филаггрина (*FLG*). Среди населения Восточной Украины его распространенность составляет 1:2557. *Цель исследования:* определение мутаций в гене филаггрина и генотипов больных ихтиозом простым в украинской популяции. Генотипирование больных показало наличие у них мутаций R501X и 2282del4 в гене *FLG*. Обнаружены гетерозиготы по нонсенс-мутации R501X, гетеро- и гомозиготы по делеции 2282del4, дигетерозиготы. Соотношение мутаций 2282del4:R501X – 4:1. Пенетрантность исследуемых мутаций у гомозигот и дигетерозигот составила 100%, мутации R501X в гетерозиготном состоянии – 100%, мутации у гетерозигот 2282del4 – 84,2%. У гомозигот по мутации 2282del4 и дигетерозигот отмечены более выраженные клинические проявления по сравнению с больными гетерозиготами, у которых степень выраженности заболевания значительно варьирует.

Ключевые слова: ихтиоз простой, филаггрин, мутации *FLG*.

Данная работа является фрагментом НИР «Особливості лікування і профілактики патологічних станів у прегравідарний період і в період гестації, та шляхи їх корекції», № гос. регистрации 0111U003583.

Введение. Ихтиоз представляет собой этиологически и клинически гетерогенную группу генодерматозов, характеризующихся нарушением ороговения и образованием чешуек на коже, напоминающих рыбью чешую [2, 5, 8, 27]. Выделяют до 30 нозологических форм ихтиоза [27], наиболее часто встречающимся из них является вульгарный ихтиоз. По данным европейских авторов, распространенность вульгарного ихтиоза варьирует от 1:80–1:250 в Англии [11, 32] до 1:129870 в Боснии и Герцеговине [6]. В Российской Федерации она составляет 1:4986, однако существенно отличается в различных регионах и этносах [1, 34]. Среди населения Восточной

Украины распространенность ихтиоза составляет в среднем 1:2557 [9].

Ихтиоз простой (ихтиоз обычный, вульгарный ихтиоз; *ichthyosis vulgaris*; *ichthyosis simplex* (Q 80.1.0, OMIM 146700) [4, 22] – аутосомно-доминантное заболевание с неполной пенетрантностью и переменной экспрессивностью [21, 28], которое обусловлено мутациями в гене эпидермального белка филаггрина (*FLG*), расположенного в локусе 1q21.3 [16]. В среднем мутации в гене филаггрина в Европе встречаются примерно у 7,7 % населения, а в Азии – у 3,0 % [29].

Филаггрин является ключевым белком, участвующим в дифференцировке клеток эпидермиса и осуществлении его барьерной функции. Он образуется в ходе конечной дифференцировки клеток зернистого слоя эпидермиса в результате посттрансляционной модификации молекул профилаггрина кератогиалиновых гранул (масса 400 кДа): молекула профилаггрина дефосфорилируется и протеолизуется с образованием 10–12 молекул филаггрина. Филаггрин связывается с кератиновыми промежуточными филаментами и другими белками цитоскелета, что приводит к коллапсу клеток и их превращению в плоские чешуйки. Образовавшийся роговой слой является барьером, который предотвращает потерю воды, проникновение возбудителей заболеваний и аллергенов [16].

В верхней части рогового слоя эпидермиса филаггрин расщепляется до аминокислот, особенно гистидина, который метаболизируется в трансуроканиновую и пирролидонкарбоновую кислоты, поддерживающие pH и являющиеся компонентами натурального увлажняющего фактора (NMF) вместе с самими аминокислотами [16].

Мутации в гене филаггрина являются причиной низкой концентрации профилаггрина в зернистом слое эпидермиса [3]. В клетках зернистого слоя эпидермиса пациентов с вульгарным ихтиозом кератогиалиновые гранулы мелкозернистые, малочисленные [17], у больных существенно нарушается пролиферативная активность клеток кожи [18]. Патоморфологические изменения наблюдаются также в клетках шиповатого и базального слоев, в базальной мембране и дерме кожи. У большей части

больных вульгарным ихтиозом выявлены уменьшение количества волосяных фолликулов и сальных желез, атрофия потовых желез [2, 7, 8].

Снижение концентрации филагрина в эпидермисе у 50 % пациентов приводит к почти полному исчезновению зернистого слоя и истончению шиповатого слоя, понижению содержания гигроскопических аминокислот NMF, трансэпидермальной потере воды и чрезмерному шелушению кожи [20, 25].

В настоящее время описано более 40 мутаций в гене филагрина (R501X, 2282del4, 3321delA, Q2417X, E2422X и др.), имеющих разную частоту в европейских, азиатских, африканских и иных популяциях [16]. В связи с этим для эффективной диагностики, профилактики и лечения вульгарного ихтиоза актуально определить мутации в гене *FLG* и генотипы больных с указанным генодерматозом в украинской популяции, что и стало **целью** данной работы.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы периферической крови 19 больных с вульгарным ихтиозом славянского происхождения, находящихся на диспансерном учете в ОККВД №1 и кожновенерологических диспансерах Харьковской области.

Тестированы две мутации в гене *FLG*: транзición 1501C-to-T (R501X) и делеция 2282del4 в 3-м экзоне в гене *FLG*. Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции ДНК «Diatom DNA Prep 100» («Isogene Lab.Ltd», РФ). Реакция амплификации проводилась с использованием пар праймеров для мутаций R501X и 2282del4 по Smith [28]. Рестрикционный анализ проведен с использованием эндонуклеаз рестрикции *Hin1II* (NlaIII) и *Adel* (DrallI) (3 часа, 37°C) («Fermentas», Литва). Электрофоретический анализ проведен в 3% и 2,5% агарозных гелях.

Результаты исследования и их обсуждение. В исследовании приняли участие пробанды, проживающие в семи районах Харьковской области. Клинико-генеалогический анализ продемонстрировал соответствие наблюдаемых фенотипов и типа наследования анализируемого дерматоза в семьях пробандов ихтиозу обычному.

Генотипирование больных по транзición 1501C-to-T (R501X) выявило мутацию в гетерозиготном состоянии у пяти человек среди больных обычным аутосомно-доминантным ихтиозом из семей, происходящих из районов западной части Харьковской области.

Тестирование делеции 2282del4 выявило ее у четырех больных в гомозиготном состоянии и у 15 – в гетерозиготном.

Среди больных трое оказались дигетерозиготами (компаунды) по двум мутациям с последующей их сегрегацией в соответствии с менделевскими закономерностями. Пример одной из семей представлен на **рис.**

Таким образом, в случайной выборке больных ихтиозом простым были выявлены характерные для

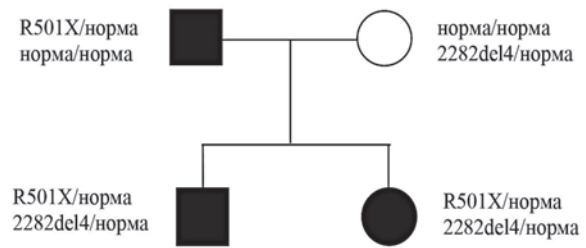


Рис. Родословная семьи с ихтиозом простым, обусловленным мутациями R501X и 2282del4 в гене *FLG*.

жителей Европы мутации в гене филагрина. Мутации R501X и 2282del4 наиболее распространены в Северной Европе, США и Австралии [29].

В Великобритании, Ирландии, Швеции, Нидерландах, Франции и ФРГ описаны мутации R2447X, S3247X, 3702delG и другие [10, 12, 13, 26, 30, 31, 33], для Италии характерна мутация R3638X [14].

По нашим данным, в выборке украинских больных соотношение мутаций 2282del4 и R501X составило 4:1. У пациентов с ихтиозом в Шотландии соотношение мутаций R501X и 2282del4 – 7:1 [26, 28]. При исследовании семейного ихтиоза в Шотландии, Ирландии и США было получено мутация R501X встречалась в два раза чаще, R501X:2282del4 как 2:1 [23]. В Ирландии, по данным других авторов, соотношение мутаций – 2,4:1 [28] и 3:4 [26], в центральноевропейских странах Австрии и Нидерландах – 2,8:1 [19]. Во Франции наблюдалась обратная картина: частота делеции 2282del4 в 2,6 раза превышала частоту нонсенс-мутации R501X [15].

Пенетрантность гомозигот по мутации 2282del4 в гене *FLG*, так же, как и дигетерозигот по мутациям R501X и 2282del4, в нашем исследовании составила 100%, что согласуется с литературными данными [23, 28]. Пенетрантность гетерозигот по мутации R501X, по нашим предварительным оценкам, – 100%, тогда как в исследовании Palmer C.N. et al. она составила 77%, у Smith F. J. D. et. al. – 83%, у Gruber R. et al. – 87% [19, 23, 28]. Пенетрантность мутации 2282del4 в гетерозиготном состоянии в нашем исследовании – 84,2%, по данным литературы – от 80% [23] до 100% [28].

В выборке украинских больных гомозиготы по мутации 2282del4 и дигетерозиготы имеют более выраженные клинические проявления по сравнению с больными гетерозиготами, у которых степень выраженности заболевания значительно варьирует. По данным литературы, у гомозигот и дигетерозигот по мутациям в гене *FLG* было выявлено почти полное исчезновение кератогиалиновых гранул и зернистого слоя эпидермиса, усиленная трансэпидермальная потеря воды и снижение гидратации кожи, тогда как у гетерозигот эти проявления существенно слабее [19, 24].

Принципиальных различий между фенотипическими проявлениями, их локализацией и степенью тяжести у больных гетерозигот с мутациями R501X

и 2282del4 не выявлено. В исследованиях R. Gruber et al. также не отмечено различий в манифестации вульгарного ихтиоза у пациентов с разными мутациями в гене *FLG* [19].

Выводы. Ихтиоз обычный, аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью, у больных в украинской популяции обусловлен мутациями 2282del4 и R501X в гене *FLG*.

Перспективы дальнейших исследований.

Изучение генетической гетерогенности и клинического полиморфизма ихтиоза простого и сопутствующих патологий позволит формировать группы риска для проведения профилактических мероприятий и является предпосылкой фармакогенетических исследований для развития персонализированной терапии.

Список литературы

1. Амелина С. С. Разнообразие наследственных заболеваний кожи у населения Ростовской области / С. С. Амелина, И. В. Ветрова, Е. В. Дегтерева [и др.] // Валеология. – 2014. – № 4. – С. 12–17.
2. Мавров И. И. Основы диагностики и лечения в дерматологии и венерологии / И. И. Мавров, Л. А. Болотная, И. М. Сербина. – Х. : Факт, 2007. – 792 с.
3. Максимов В. Н. Делеция 2282del4 в гене филаггрина в популяции жителей Новосибирска и у больных вульгарным ихтиозом / В. Н. Максимов, И. В. Куликов, С. Е. Семаев [и др.] // Мед. генетика. – 2007. – № 8. – С. 21–23.
4. МКБ-10. Міжнародна статистична класифікація хвороб та споріднених проблем охорони здоров'я. – Десятий перегляд. – К. : Здоров'я, 2001. – Т. 3. – 817 с.
5. Мордовцев В. Н. Заболевания кожи с наследственным предрасположением / В. Н. Мордовцев, П. М. Алиева, А. С. Сергеев. – М. : ДНЦ РАН, 2002. – 260 с.
6. Мутевелич-Арсланагич Н. Генодерматозы на территории Республики Боснии и Герцеговины / Н. Мутевелич-Арсланагич // Вестн. дерматологии и венерологии. – 1992. – № 4. – С. 40–42.
7. Патоморфология болезней кожи : Руководство для врачей / [Г. М. Цветкова, В. В. Мордовцева, А. М. Вавилов, В. Н. Мордовцев]. – М. : Медицина, 2003. – 496 с.
8. Суворова К. Н. Наследственные дерматозы / К. Н. Суворова, А. А. Антоньев. – М. : Медицина, 1977. – 230 с.
9. Федота О. М. Генодерматозы в дослідженні проблем генетичної безпеки людини : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора біол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / О. М. Федота. – К., 2012. – 40 с.
10. Ballardini N. Eczema severity in preadolescent children and its relation to sex, filaggrin mutations, asthma, rhinitis, aggravating factors and topical treatment: a report from the BAMSE birth cohort / N. Ballardini, I. Kull, C. Söderhäll [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2013. – Vol. 168, № 3. – P. 588–594.
11. Brown S. J. Filaggrin haploinsufficiency is highly penetrant and is associated with increased severity of eczema: further delineation of the skin phenotype in a prospective epidemiological study of 792 school children / S. J. Brown, C. L. Relton, H. Liao [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2009. – Vol. 161, № 4. – P. 884–889.
12. Brown S. J. Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: a population-based case-control study / S. J. Brown, C. L. Relton, H. Liao [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 121, № 4. – P. 940–946.
13. Brown S. J. Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema / S. J. Brown, A. Sandilands, Y. Zhao [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2008. – Vol. 128, № 6. – P. 1591–1594.
14. Cascella R. Full sequencing of the FLG gene in Italian patients with atopic eczema: evidence of new mutations, but lack of an association / R. Cascella, V. F. Cuzzola, T. Lepre [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2011. – Vol. 131, № 4. – P. 982–984.
15. Ezzedine K. Usefulness of a global clinical ichthyosis vulgaris scoring system for predicting common FLG null mutations in an adult caucasian population / K. Ezzedine, C. Droitcourt, C. Ged [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2012. – Vol. 167, № 5. – P. 1165–1169.
16. Filaggrin: Basic science, epidemiology, clinical aspects and management / Eds. J. P. Thyssen, H. I. Maibach. – Heidelberg : Springer, 2014. – 373 p.
17. Fleckman P. Absence of the granular layer and keratohyalin define a morphologically distinct subset of individuals with ichthyosis vulgaris / P. Fleckman, S. Brumbaugh // Exp. Dermatol. – 2002. – Vol. 11, № 4. – P. 327–336.
18. Frost P. Ichthyosiform dermatoses: classification based on anatomic and biometric observations / P. Frost, E. J. van Scott // Arch. Dermatol. – 1966. – Vol. 94, № 2. – P. 113–126.
19. Gruber R. Filaggrin mutations p. R501X and c. 2282del4 in ichthyosis vulgaris / R. Gruber, A. R. Janecke, C. Fauth [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2007. – Vol. 15, № 2. – P. 179–184.
20. Kezic S. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum / S. Kezic, P. M. J. H. Kemperman, E. S. Koster [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2008. – Vol. 128, № 8. – P. 2117–2119.
21. Oji V. Ichthyosis: clinical manifestations and practical treatment options / V. Oji, H. Traupe // Am. J. Clin. Dermatol. – 2009. – Vol. 10, № 6. – P. 351–364.
22. OMIM®. Online Mendelian Inheritance in Man®: an online catalog of human genes and genetic disorders. – 1996–2015. – Режим доступу: omim.org (дата звернення 30. 11. 2015). – Назва з екрана.
23. Palmer C. N. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis / C. N. Palmer, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski [et al.] // Nat. Genet. – 2006. – Vol. 38, № 4. – P. 441–446.
24. Perusquía-Ortiz A. M. Complete filaggrin deficiency in ichthyosis vulgaris is associated with only moderate changes in epidermal permeability barrier function profile / A. M. Perusquía-Ortiz, V. Oji, M. C. Sauerland [et al.] // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2013. – Vol. 27, № 12. – P. 1552–1558.
25. Rawlings A. V. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to dry skin cycle / A. V. Rawlings, P. J. Matts // J. Invest. Dermatol. – 2005. – Vol. 124, № 6. – P. 1099–1110.
26. Sandilands A. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema / A. Sandilands, A. Terron-Kwiatkowski, P. R. Hull [et al.] // Nat. Genet. – 2007. – Vol. 39, № 5. – P. 650–654.

27. Schmuth M. Inherited ichthyoses/generalized Mendelian disorders of cornification / M. Schmuth, V. Martinz, A. R. Janecke [et al.] // Eur. J. Hum. Gen. – 2013. – Vol. 21, № 2. – P. 123–133.
28. Smith F. J. D. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris / F. J. D. Smith, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski [et al.] // Nat. Genet. – 2006. – Vol. 38, № 3. – P. 337–342.
29. Thyssen J. P. Ichthyosis vulgaris: the filaggrin mutation disease / J. P. Thyssen, E. Godoy-Gijon, P. M. Elias // Br. J. Dermatol. – 2013. – Vol. 168, № 5. – P. 1155–1166.
30. Visser M. J. Impact of loss-of-function mutations in the filaggrin gene and atopic dermatitis on the development of occupational irritant contact dermatitis / M. J. Visser, L. Landeck, L. E. Campbell [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2013. – Vol. 168, № 2. – P. 326–332.
31. Weidinger S. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children / S. Weidinger, M. O'Sullivan, T. Illig [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2008. – Vol. 121, № 5. – P. 1203–1209.
32. Wells R. S. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population / R. S. Wells, C. B. Kerr // Brit. Med. J. – 1966. – № 1 (5493). – P. 947–950.
33. Winge M. C. Lack of association between filaggrin gene mutations and onset of psoriasis in childhood / M. C. Winge, J. Suneson, J. Lysell [et al.] // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2011. – Vol. 27, № 1. – P. e124–e127.
34. Zinchenko R. A. Prevalences of hereditary diseases in different populations of Russia / R. A. Zinchenko, G. I. El'chinova, N. V. Baryshnikova [et al.] – 2007. – Vol. 43, № 9. – P. 1038–1045.

УДК 616. 5-003. 871 + 575. 224. 232. 52

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *FLG* У ХВОРИХ НА ІХТІОЗ ПРОСТИЙ

Федота О. М., Рощенко Л. В., Воронцов В. М., Солодянкін О. С., Садовниченко Ю. О., Гонтар Ю. В.

Резюме. Іхтіоз являє собою етіологічно та клінічно гетерогенну групу генодерматозів, що характеризуються порушенням зроговіння і утворенням лусочок на шкірі. Найбільш поширеною формою є іхтіоз простий, аутосомно-домінантний, з неповною пенетрантністю, зумовлений мутаціями в гені філаггріну (*FLG*). Серед населення Східної України його поширеність становить 1:2557. *Мета дослідження:* визначення мутацій у гені філаггріну і генотипів хворих на іхтіоз простий в українській популяції. Генотипування хворих показало наявність у них мутацій R501X і 2282del4 у гені *FLG*. Виявлені гетерозиготи за нонсенс-мутацією R501X, гетеро- і гомозиготи за делецією 2282del4, дигетерозиготи. Співвідношення мутацій 2282del4:R501X – 4:1. Пенетрантність досліджуваних мутацій у гомозигот і дигетерозигот склала 100%, мутації R501X у гетерозиготному стані – 100%, мутації у гетерозигот 2282del4 – 84,2%. У гомозигот за мутацією 2282del4 і дигетерозигот відзначені більш виражені клінічні прояви у порівнянні з хворими гетерозиготами, у яких ступінь вираженості захворювання значно варіює.

Ключові слова: іхтіоз простий, філаггрін, мутації *FLG*.

UDC 616. 5-003. 871 + 575. 224. 232. 52

Polymorphism of *FLG* Gene in Patients with Ichthyosis Vulgaris

Fedota O. M., Roshcheniuk L. V., Vorontsov V. M., Solodyankin O. S., Sadovnychenko I. A., Gontar J. V.

Abstract. Ichthyosis is a heterogeneous group of scaling disorders that are classified on the basis of clinical presentation, histopathologic change, and pattern of inheritance. Accounting to more than 95% of ichthyosis cases, the most common form of disease is autosomal dominant ichthyosis vulgaris (IV; OMIM #146700). It affects approximately one in 2557 people in Ukraine. Loss-of-function mutations in a gene coding for filaggrin protein (*FLG*) are strongly associated with IV and disrupt the skin barrier. More than 40 *FLG* gene mutations have been discovered, all leading to loss of filaggrin expression. Two most common mutations in European populations (R501X and 2282del4) have been reported to cause the skin abnormalities in IV. As it was previously described/discovered these mutations are inherited in semidominant pattern where heterozygotes manifest a moderate phenotype with 80–100% penetrance while homozygotes and compound heterozygotes manifest a severe phenotype. These findings prompted us to investigate mutations in *FLG* gene and corresponding patient's genotypes in Ukrainian population.

Nineteen patients with a marked generalized scaling phenotype from Kharkiv region (East Ukraine) were tested in this study. Each patient was genotyped for the two most prevalent *FLG* null mutations (R501X and 2282del4) by PCR-RFLP.

The presence of *FLG* mutations in all IV patients was revealed. In five patients R501X mutation in heterozygous condition was found. All of them were members of families from Western districts of Kharkiv region. Genotyping of these patients for 2282del4 mutation revealed it in four individuals in homozygous condition and in 15 patients in heterozygous one. Three individuals were compound heterozygous for both mutations in *FLG* gene. Thus the two mutations (R501X and 2282del4), the most common for European populations, have been also detected in Kharkiv region of Ukraine. We estimated 2282del4:R501X mutation ratio in the East Ukrainian population as 4:1.

The penetrance of *FLG* null mutations was 100% in homozygotes for 2282del4 and compounds, 100% in heterozygous individuals with R501X mutation and 84.2% in heterozygous individuals with 2282del4 mutation. Homozygotes for 2282del4 mutation and compound heterozygotes manifest a severe phenotype then afflicted heterozygous individuals with significantly different phenotypes.

Keywords: ichthyosis, filaggrin, *FLG* mutations.

Стаття надійшла 08.12.2015 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування