

На правах рукописи

Беляева Татьяна Михайловна

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ФИЛАГГРИНА В ФОРМИРОВАНИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ИСТИННОЙ ЭКЗЕМЫ У НАСЕЛЕНИЯ
ЦЕНТРАЛЬНОГО ЧЕРНОЗЕМЬЯ РОССИИ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Белгород – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Научный руководитель: **Пономаренко Ирина Васильевна**
Доктор медицинских наук

**Официальные
оппоненты:**

Зинченко Рена Абульфазовна
Доктор медицинских наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Медико-генетический
научный центр» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации,
заместитель директора по научно-клинической
работе, заведующая лабораторией генетической
эпидемиологии

Амелина Светлана Сергеевна,
Доктор медицинских наук,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Ростовский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
профессор кафедры гематологии и
трансфузиологии с курсами клинической
лабораторной диагностики, генетики и
лабораторной генетики.

Защита диссертации состоится «3» декабря 2020 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета БелГУ.03.01 при ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» и на сайте <https://www.bsu.edu.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета БелГУ.03.01,
доктор биологических наук, доцент

И.Н. Сорокина

Введение

Актуальность темы исследования

Экзема – острое или хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи, формирующееся под влиянием экзогенных и эндогенных триггерных факторов и характеризующееся появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией, обусловленной серозным воспалением кожи, и сильным зудом (Федеральные клинические рекомендации, 2016). Распространенность экземы среди населения мира составляет 10-20% (Zhu J. et al., 2019; Minzaghi D. et al., 2019). При этом встречаемость экземы в странах Западной Европы выше, чем в странах Восточной Европы, Африки, Центральной Азии и Китае (Kim J.E. et al., 2016). Заболевание оказывает серьезное негативное влияние на качество жизни больных (Wallmeyer L. et al., 2017). Экзема распространена у 10-20% детей, нередко манифестирует в раннем детстве, причем до 45% всех случаев заболевания проявляется в первые 6 месяцев жизни (Tanjung S. et al., 2017; Chovatiya R. et al., 2019). Согласно данным литературы, в США общие экономические затраты на лечение экземы составляют более 4,2 млрд. долларов в год (Margolis D.J. et al., 2018).

Экзема является мультифакторным заболеванием, развитие которого определяется полигенной основой (наследственная предрасположенность предопределяет различные нарушения со стороны кожных покровов, нервной, эндокринной, иммунной систем) и действием провоцирующих факторов экзогенной (бактериальные и грибковые инфекционные агенты, химические вещества, физические факторы, лекарственные препараты, пищевые продукты) и эндогенной (антигены микроорганизмов из очагов хронической инфекции) природы (Федеральные клинические рекомендации, 2016; Завадский В.Н. 2018; Kim J.E. et al., 2016; Al-Shobaili H.A. et al., 2016; Rerknimitr P. et al., 2017; Martin M.J. et al., 2020). Близнецовые и семейные исследования свидетельствуют о существенной роли наследственных факторов (72-90%) в формировании экземы (Kim K.W. et al., 2015; Al-Afif K.A.M. et al., 2019; Johansson Å. et al., 2019). Вероятность возникновения заболевания составляет около 40% при наличии экземы у одного из родителей, и этот показатель достигает уровня 50-60% при наличии заболевания у обоих родителей (Федеральные клинические рекомендации, 2016).

Степень разработанности темы исследования

Изучению молекулярно-генетических основ экземы посвящено достаточно большое количество работ (Гималова Г.Ф. и др., 2016; Esparza-Gordillo J. et al., 2009; Sun L. et al., 2011; Paternoster L. et al., 2011, 2015; Hirota T. et al., 2012; Weidinger S. et al., 2013; Baurecht H. et al., 2015; Schaarschmidt H. et al., 2015; Kim K.W. et al., 2015; Marenholz I. et al., 2015; Gimalova G.F. et al., 2016; Johansson Å. et al., 2019). Активно проводится поиск генетических детерминант заболевания с использованием методов полно-геномного анализа ассоциаций (GWAS). К настоящему времени (февраль 2020г.), согласно данным GWAS каталога

(https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/EFO_0000274), в мире различными научными коллективами проведено одиннадцать полно-геномных исследований экземы (в зарубежных литературных источниках синонимом экземы является атопический дерматит [MIM 603165] (Baurecht H. et al., 2015; Kantor R. et al., 2016; Weidinger S. et al., 2016)), в результате которых выявлено более 100 GWAS-значимых полиморфных локусов, вовлеченных в формирование заболевания (Esparza-Gordillo J. et al., 2009; Sun L. et al., 2011; Paternoster L. et al., 2011, 2015; Hirota T. et al., 2012; Weidinger S. et al., 2013; Baurecht H. et al., 2015; Schaarschmidt H. et al., 2015; Kim K.W. et al., 2015; Marenholz I. et al., 2015; Johansson Å. et al., 2019). Однако, при этом, следует отметить, что лишь небольшое количество GWAS-значимых для экземы полиморфных локусов реплицированы в различных популяциях.

Важный вклад в формирование подверженности к развитию экземы вносят мутации в гене филаггрина (Marenholz I. et al., 2015; Bin L. et al., 2016; Chan A. et al., 2018). Различными научными коллективами активно изучаются ассоциации мутаций гена филаггрина, связанных с потерей функции (loss-of-function variants), с формированием экземы (Visser M.J. et al., 2014; Meng L. et al., 2014; Park K.Y. et al., 2016; On H.R. et al., 2017; Margolis D.J. et al., 2018; Moosbrugger-Martinz V. et al., 2019). Так же показаны ассоциации ряда полиморфных локусов гена филаггрина с развитием экземы и по данным полно-геномных исследований (Sun L. et al., 2011; Baurecht H. et al., 2015; Schaarschmidt H. et al., 2015; Marenholz I. et al., 2015; Paternoster L. et al., 2015). При этом, следует отметить, что подавляющее число работ, направленных на поиск молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с развитием экземы, выполнено за рубежом, а в России такие исследования единичные (Гималова Г.Ф. и др., 2016; Gimalova G.F. et al., 2016), что диктует необходимость продолжения проведения исследований молекулярно-генетических основ экземы в различных популяциях России.

Цель исследования

Изучить вовлеченность полиморфных локусов гена филаггрина в формирование хронической истинной экземы у населения Центрального Черноземья России.

Задачи исследования

1. Выявить ассоциации полиморфных локусов гена филаггрина с развитием хронической истинной экземы.
2. Оценить связь гаплотипов полиморфных локусов гена филаггрина с формированием заболевания.
3. Провести анализ SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с развитием хронической истинной экземы.
4. Установить пол-специфические эффекты полиморфных локусов гена филаггрина, определяющих подверженность к хронической истинной экземе.
5. Рассмотреть функциональные эффекты полиморфизма гена филаггрина, связанного с развитием заболевания.

Научная новизна

Впервые установлена вовлеченность полиморфизма гена *FLG* в формирование хронической истинной экземы (ХИЭ) у жителей Центрального Черноземья России. Реплицированы ассоциации девяти GWAS-значимых полиморфных локусов. Определены полиморфные варианты гена *FLG*, являющиеся «рисковыми» для возникновения заболевания. Выявлены гаплотипы и SNP x SNP взаимодействия полиморфных локусов гена *FLG*, связанные с формированием хронической истинной экземы. Установлен более значимый вклад полиморфизма гена *FLG* в подверженность к заболеванию у женщин в сравнении с мужчинами. Выявлены выраженные функциональные эффекты 10 SNPs гена филагрина, определяющие вовлеченность в развитие заболевания 38 генов-кандидатов. Показаны конкретные биологические пути, лежащие в основе ассоциаций генов-кандидатов с развитием хронической истинной экземы.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты диссертационной работы расширяют представления о молекулярно-генетических детерминантах формирования хронической истинной экземы и роли полиморфизма гена филагрина в развитии заболевания. Полученные в ходе исследования данные, могут использоваться в практической дерматологии при профилактических осмотрах (обследовании) клинически здоровых индивидуумов для формирования среди них групп повышенного риска развития экземы. Кроме того, результаты настоящего исследования могут использоваться при повышении квалификации медработников и при чтении специальных курсов по медицинской и клинической генетике, дерматовенерологии в вузах медицинского профиля.

Результаты данной работы применяются в практической деятельности врачей - дерматовенерологов ОБУЗ «Курский областной клинический кожно-венерологический диспансер», а также в учебной деятельности ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена в дизайне «больные-контроль» на репрезентативных выборках пациентов с хронической истинной экземой (n=350) и контрольной группы (n=306). Отбор SNPs для данного молекулярно-генетического исследования осуществлен в соответствии с современными требованиями (значимые ассоциации с хронической истинной экземой в предыдущих исследованиях, регуляторный эффекты, влияние на экспрессию генов и др.). Анализ полиморфных локусов гена *FLG* проводили в НИЛ «Молекулярной генетики человека» НИУ БелГУ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени на термоциклере CFX-96. Статистическая обработка полученных данных проводилась современными методами с использованием таких программ как gPLINK, Haploview, MDR, MB-MDR, Quanto, с учетом ковариат и оценкой мощности установленных ассоциаций. Оценка

функционального значения рассматриваемых полиморфных локусов гена *FLG*, ассоциированных с развитием ХИЭ и сильно сцепленных ($r^2 \geq 0,80$) с ними SNPs (несинонимические замены, регуляторный потенциал, связи с экспрессией генов, общие биологические пути) выполнялась с помощью современных мировых баз данных (HaploReg, eEnsembl, GTExportal, Gene Ontology, GeneMANIA).

Положения, выносимые на защиту

1. Полиморфизм гена *FLG* определяет подверженность к развитию хронической истинной экземы у жителей Центрального Черноземья России.
2. Альтернативные аллели rs3126085 и rs12144049 гена *FLG* ассоциированы с повышенным риском возникновения заболевания.
3. Существенный вклад в развитие хронической истинной экземы вносят гаплотипы и SNP x SNP взаимодействия полиморфных локусов гена *FLG*.
4. Ассоциации полиморфизма гена *FLG* с хронической истинной экземой характеризуются половым диморфизмом.
5. Основными биологическими путями, лежащими в основе вовлеченности 38 генов-кандидатов в формирование заболевания, являются дифференцировка кератиноцитов и кератинизация, развитие эпидермиса, формирование кожного барьера и регулирование водного обмена в коже, процессы, опосредованные кальций-связывающими белками и в том числе кальмодулином, запрограммированная гибель клеток.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается репрезентативным объемом выборок, включенных в исследование, обработкой полученных данных современными генетико-статистическими методами с использованием биоинформатических он-лайн ресурсов.

Материалы диссертационного исследования были представлены на российских и международных конференциях: шестой международной дистанционной научной конференции, посвященной 80-летию Курского государственного медицинского университета «Инновации в медицине» (Курск, 2014), IV, V Междисциплинарном медицинском форуме «Актуальные вопросы совершенствования медицинской помощи и профессионального медицинского образования» (Белгород, 2019, 2020), II Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2020» (Санкт-Петербург, 2020), Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2020), II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (Харків, 2020).

Личный вклад

Автором определены цель и задачи настоящего исследования, а также разработаны подходы для их решения, выполнено клиническое обследование больных хронической истинной экземой и индивидуумов контрольной группы, осуществлен сбор анамнестических данных. Соискатель лично участвовал в проведении молекулярно-генетических исследований, выполнил статистическую обработку данных используя современные методы генетико-эпидемиологического анализа и обобщил полученные результаты. По итогам данной работы лично автором подготовлены основные публикации, проведена апробация результатов, написана и оформлена рукопись.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, из них 1 статья в журнале, индексируемом в базах Scopus, Web of Science.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 151 страницах машинописного текста и состоит из введения, основных глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результатов исследования), обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и электронного приложения. Диссертация иллюстрирована 35 рисунками и 26 таблицами. Библиографический список включает 153 литературных источника, из них 23 - отечественных и 130 - зарубежных.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования, характеристика групп исследования

Сформированная в рамках данной работы выборка включала 656 индивидуумов, из них 350 больных хронической истинной экземой и 306 человек контрольной группы. Исследование выполнено в дизайне «больные-контроль». Клиническое и клинико-лабораторное обследование больных осуществлялось на базах ОБУЗ «Курский областной клинический кожно-венерологический диспансер» и ОГБУЗ «Кожно-венерологический диспансер» г. Белгорода. Группа контроля формировалась при профилактических осмотрах населения. Среди 350 пациентов с ХИЭ женщины составили 67,71% (n=237), мужчины – 32,29% (n=113). Группа контроля (n=306) включала 70,59% (n=216) женщин и 29,41% (n=90) мужчин. Показатели среднего возраста больных ХИЭ ($42,73 \pm 17,53$ лет, от 18 до 86 лет) соответствовали контролю ($42,56 \pm 15,42$ лет, от 17 до 88 лет) ($p > 0,05$).

Отбор полиморфных локусов для исследования

Для данной работы было отобрано 10 полиморфных локусов гена *FLG* (rs12130219, rs558269137, rs61816761, rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144, rs10888499, rs77199844, rs4363385). Среди них все 10 SNPs (100%) были ассоциированы с развитием экземы (атопического дерматита) по

данным ранее проведенных исследований (в том числе 9 SNPs по данным GWAS), 4 SNPs имеют ассоциации с заболеваниями, имеющими общие с экземой (атопическим дерматитом) биологические пути по данным ранее проведенных исследований (псориаз, астма и др.). Все 10 SNPs (100%) имеют значимый регуляторный потенциал, в том числе 2 полиморфизма связаны с потерей функции белка филаггрина (loss-of-function variants): rs558269137 (2282delACTG) (frameshift variant) и rs61816761 (R501X) (stop gained). Все включенные в исследование 10 SNPs (100%) имеют eQTL значение (оказывают влияние на экспрессию генов).

Молекулярно-генетические методы

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужила ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической венозной крови исследуемых индивидуумов, стандартным методом фенольно-хлороформным экстракции. Анализ полиморфных локусов гена *FLG* проводили в НИЛ «Молекулярной генетики человека» НИУ БелГУ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad Laboratories, USA) с использованием наборов реагентов для амплификации ДНК с соответствующими олигонуклеотидными праймерами и зондами, синтезированными ООО «Тест - Ген» (Ульяновск).

Методы статистической обработки

Выполнена оценка соответствия эмпирического распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга.

Изучение ассоциаций полиморфных локусов гена *FLG* с развитием ХИЭ проводилось с помощью программного обеспечения gPLINK v2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) методом логистического регрессионного анализа, в рамках тестирования трех генетических моделей: аддитивной, рецессивной и доминантной. В исследование включали ковариаты возраст и пол. Для минимизации ошибок 1-го рода, которые связаны с ложноположительными результатами, использовали адаптивный пермутационный тест (p_{perm}). Характер ассоциации полиморфных локусов гена *FLG* с формированием ХИЭ оценивали на основании значения показателя отношения шансов (OR) и его 95% доверительного интервала (95%CI).

Выполнен расчет мощности выявленных ассоциаций полиморфных локусов гена *FLG* с формированием ХИЭ с использованием программного обеспечения Quanto (v.1.2.4) (<http://biostats.usc.edu/Quanto.html>) (учитывался двухсторонний критерий уровня значимости для каждой рассматриваемой генетической модели при 5% ошибке 1-го рода, $\alpha=0,05$).

С помощью программы Haploview v.4.2 (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) проведен анализ неравновесия по сцеплению между парами SNPs и построены гаплоблоки. Неравновесие по сцеплению между рядом расположенными SNPs оценивали с использованием коэффициента D' , предложенного Левонтином и

коэффициента корреляции r^2 Пирсона. В соответствии с алгоритмами «Solid Spine» и «Four gamete frequencies» с заданным порогом $D' > 0,8$ определялась блочная структура. Проведен анализ ассоциаций гаплотипов с ХИЭ с учетом ковариат (возраст и пол). За статистически значимый уровень принимали $p_{perm} < 0,05$.

Для анализа SNP×SNP взаимодействий, ассоциированных с развитием ХИЭ использовали метод снижения размерности в модификации Model-Based-MDR (MB-MDR). Метод MDR использовался для визуализации характера и силы SNP×SNP взаимодействий в виде дендрограммы и графа.

Выполнена оценка функционального значения полиморфных локусов гена *FLG*, ассоциированных с развитием ХИЭ и сильно сцепленных ($r^2 \geq 0,80$) с ними SNPs. С использованием программы HaploReg (v4.1) определялись SNPs, находящиеся в неравновесии по сцеплению с исследуемыми полиморфными локусами гена *FLG*, вовлеченными в формирование заболевания. Данные о несинонимичных SNPs (nsSNPs) и их предиктивном потенциале получены с использованием базы данных eEnsembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Регуляторные эффекты SNPs оценивались с помощью программы HaploReg. С использованием программного обеспечения GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) изучены ассоциации анализируемых SNPs с экспрессией генов (eQTL) и их связь уровнем альтернативного сплайсинга генов (sQTL) в различных органах и тканях.

Проведен анализ биологических путей установленных в работе генов-кандидатов ХИЭ с помощью программы Gene Ontology (<http://geneontology.org>). Изучена генетическая сеть взаимодействий генов-кандидатов, вовлеченных в формирование ХИЭ с использованием программы GeneMANIA (<http://genemania.org>).

Результаты и обсуждение

Исследование ассоциаций полиморфных локусов гена филаггрина с формированием хронической истинной экземы

В работе установлено, что генетические варианты А rs3126085 и С rs12144049 связаны с развитием ХИЭ (согласно доминантной модели $OR=1,79$, 95%CI 1,21-2,65, $p_{perm}=0,002$, мощность ассоциации-90,46% и $OR=1,63$, 95%CI 1,16-2,28, $p_{perm}=0,004$, мощность-85,97% соответственно).

Полученные нами данные согласуются с результатами ранее проведенных полногеномных исследований. В работе Sun L. et al. (2011) для населения Китая (этническая группа Han) установлена значимая ассоциация аллеля G rs3126085 *FLG* с формированием заболевания, имеющая протективную направленность ($OR=0,82$, $p=5,90 \times 10^{-12}$). «Рисковое» значение аллеля С полиморфного локуса rs12144049 гена *FLG* при развитии заболевания ($OR=1,53$, $p=2,7 \times 10^{-30}$) показано в полногеномном исследовании Vaurecht H. et al. (2015).

Выявлено, что аллель А rs3126085, являющийся фактором риска развития ХИЭ, повышает афинность к транскрипционным факторам Foxp3 ($\Delta LOD=1,6$) и TEF ($\Delta LOD=12,0$), связан с пониженной экспрессией гена *FLG*

($\beta=-0,22$, $p=3,7*10^{-8}$) и повышенной транскрипцией гена *RPI-9IG5.3* ($\beta=0,38$, $p=2,0*10^{-5}$) в коже. «Рисковый» для ХИЭ аллель С rs12144049 повышает сродство к факторам транскрипции Irf ($\Delta\text{LOD}=1,5$), Obox6 ($\Delta\text{LOD}=2,2$), снижает афинность к транскрипционному фактору ZEB1 ($\Delta\text{LOD}=-2,6$) и связан с более высокой продукцией гена *CRNN* в коже ($\beta=0,30-0,32$, $p\leq 3,0*10^{-8}$).

Таким образом, установленная в настоящем исследовании связь «рискового» для ХИЭ генетического варианта полиморфизма rs3126085 с низкой экспрессией гена *FLG* в коже полностью соответствует современным представлениям о роли филаггрина в этиопатогенезе данного заболевания. Согласно литературным данным филаггрин играет ключевую роль в формировании барьера кожи, поддержании уровня гидратации в эпидермисе, регуляции pH кожи, антибактериальной защите и устойчивости кожи к ультрафиолетовому излучению (Jarrett R. et al., 2016; Clausen M.L. et al., 2018; Margolis D.J. et al., 2018). Недостаток филаггрина лежит в основе патогенеза различных кожных болезней (экзема, аллергический контактный дерматит, вульгарный ихтиоз), а также связан с формированием не кожных заболеваний (сахарный диабет, воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта) (Ziyab A.H. et al., 2017; Ćepelak I. et al., 2019).

Определена структура гапблоков у больных ХИЭ и контроля (рисунок 1). Выявлено, что гаплотип delGGC гапблока rs558269137-rs61816761-rs3126085-rs12144049 гена *FLG*, в состав которого входит «нулевой» аллель rs558269137 (delACTG), более чем в 8 раз повышает риск развития ХИЭ ($\text{OR}=8,16$, $p_{\text{perm}}=0,026$), а гаплотип WGGT («нулевой» аллель rs558269137 отсутствует) имеет протективное значение при возникновении заболевания ($\text{OR}=0,62$, $p_{\text{perm}}=0,001$).

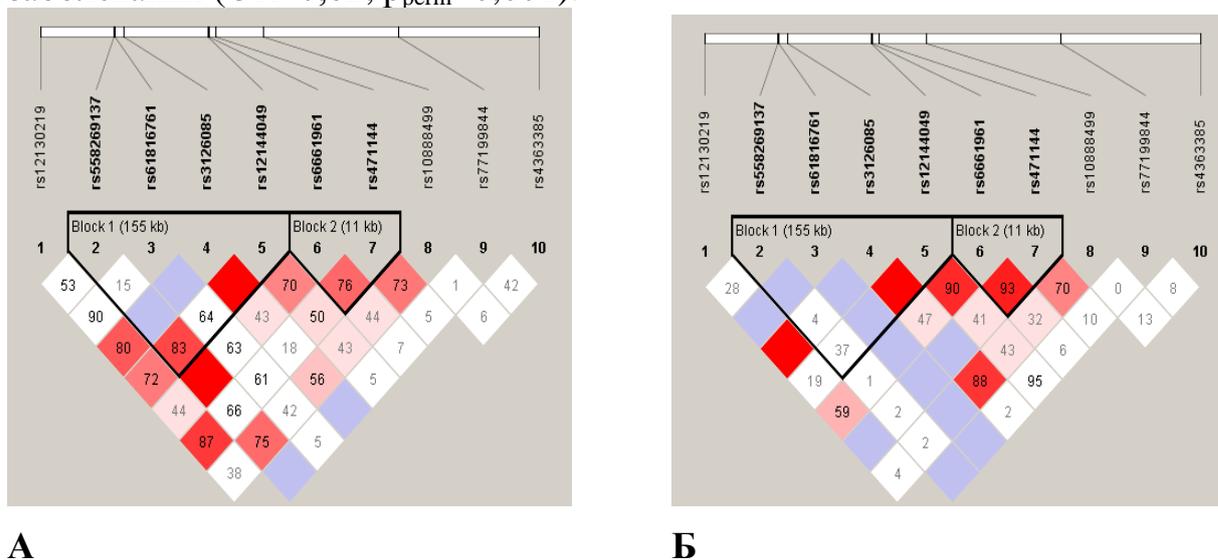


Рисунок 1. Структура неравновесия по сцеплению между исследуемыми полиморфными локусами гена *FLG* у больных ХИЭ (А) и контроля (Б). В ячейках указаны значения коэффициента сцепления D' по Левонтину (при $D' = 1$ ячейка пустая). Цвет ячейки отражает силу сцепления между полиморфизмами: красный – сильное сцепление ($D'=1$; $\text{LOD}>2$); розовый – значительное сцепление ($D'<1$; $\text{LOD}>2$); белый – слабое сцепление ($D'<1$; $\text{LOD}<2$). Для выделения гапблоков (на рисунках обозначены черным контуром) использовался алгоритм «Four gamete frequencies».

О значимой роли «нулевого» аллеля delACTG rs558269137 гена *FLG* в формировании экземы свидетельствуют и литературные данные. В работе Schuttelaar M.L. et al. (2009) установлено, что мутация delACTG rs558269137 является фактором риска развития экземы на первом году (OR=8,20) и до 8 лет (OR=6,0), а также сенсibilизации организма в 8-летнем возрасте (OR=5,4).

Согласно наших данных «нулевой» аллель rs558269137 (delACTG) ассоциирован с более низкой транскрипцией гена *FLG* ($\beta=-0,44$, $p=9,8*10^{-9}$) и повышенной экспрессией гена *LINGO4* ($\beta=1,01$, $p=4,1*10^{-14}$) в коже. Это согласуется с литературными данными о том, что мутации в гене *FLG*, связанные с потерей функции, приводят к снижению синтеза филаггрина в коже, что способствует возникновению функциональных дефектов эпидермального барьера (Wallmeyer L. et al., 2017).

Далее с использованием метода MB-MDR выявлено 10 наиболее значимых моделей SNP×SNP взаимодействий, связанных с развитием ХИЭ (3 модели двухлокусных взаимодействий, 4 – трехлокусных и 3 – четырехлокусных, $p_{perm}<0,001$), в состав которых включены 7 SNPs (таблица 1). В наибольшее число моделей входят полиморфные локусы rs12144049 (10 моделей) и rs12130219 (7 моделей). Следует подчеркнуть, что полиморфный локус rs12144049 участвует в формировании всех 10 наиболее значимых моделей SNP×SNP взаимодействий. В качестве примера на рисунке 2 приведен граф одной из наиболее значимых четырехлокусных моделей SNP×SNP взаимодействий гена *FLG*, ассоциированных с развитием ХИЭ – rs12130219 x rs10888499 x rs12144049 x rs3126085.

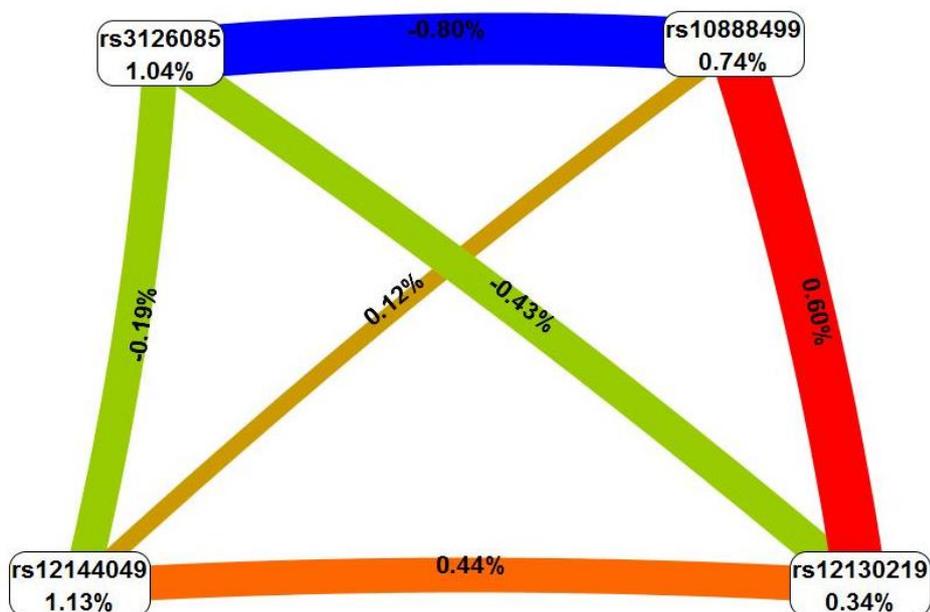


Рисунок 2. Граф наиболее значимого четырехлокусного SNP×SNP взаимодействия гена *FLG* ($P_{perm}<0,001$), вовлеченного в формирование ХИЭ (получен методом MDR). Характеризует силу и направленность влияния полиморфных локусов и их сочетаний на развитие ХИЭ (% энтропии). При обозначении полиморфизма указан rs SNP. Красный и оранжевый цвет линии указывают на выраженный и умеренный синергизм, коричневый–независимый эффект, зеленый и синий–умеренный и выраженный антагонизм соответственно.

Таблица 1

Модели SNP x SNP взаимодействий гена *FLG*, вовлеченные в формирование ХИЭ

N	Модели SNP x SNP взаимодействий	NH	<i>beta</i> H	WH	NL	<i>beta</i> L	WL	P _{perm}
Двухлокусные модели ($p < 1,2 \cdot 10^{-4}$)								
1	rs10888499 x rs12144049	1	0,581	4,80	1,00	-0,852	18,38	< 0,001
2	rs12144049 x rs3126085	2	0,536	9,45	1,00	-0,676	18,05	< 0,001
3	rs12130219 x rs12144049	1	0,596	8,89	1,00	-0,637	14,93	< 0,001
Трехлокусные модели ($p < 2,2 \cdot 10^{-6}$)								
1	rs12130219 x rs10888499 x rs12144049	4	0,858	22,43	3,00	-0,741	21,15	< 0,001
2	rs12130219 x rs12144049 x rs3126085	3	0,676	13,50	1,00	-0,874	22,13	< 0,001
3	rs12130219 x rs6661961 x rs12144049	3	0,757	12,41	3,00	-0,831	19,89	< 0,001
4	rs10888499 x rs4363385 x rs12144049	2	1,135	8,53	2,00	-0,963	19,56	< 0,001
Четырехлокусные модели ($p < 1,6 \cdot 10^{-6}$)								
1	rs12130219 x rs6661961 x rs12144049 x rs3126085	2	1,170	9,13	3,00	-1,297	29,68	< 0,001
2	rs12130219 x rs10888499 x rs12144049 x rs3126085	4	0,794	14,58	3,00	-0,894	26,43	< 0,001
3	rs12130219 x rs12144049 x rs471144 x rs3126085	1	1,151	4,04	2,00	-0,894	22,98	< 0,001

Примечание: получены методом MB-MDR с учетом коррекции на ковариаты;

NH – количество значимых сочетаний генотипов, связанных с повышенным риском развития ХИЭ;

beta H – коэффициент линейной регрессии для сочетаний генотипов, связанных с повышенным риском развития ХИЭ;

WH – статистика Вальда для сочетаний генотипов, связанных с повышенным риском развития ХИЭ;

NL – число значимых сочетаний генотипов, связанных с пониженным риском развития ХИЭ;

beta L – коэффициент линейной регрессии для сочетаний генотипов, связанных с пониженным риском развития ХИЭ;

WL – статистика Вальда для сочетаний генотипов, связанных с пониженным риском развития ХИЭ;

P_{perm} – уровень значимости моделей после проведенного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

Анализ пол-специфических эффектов полиморфных локусов гена филаггрина при формировании хронической истинной экземы

Установлено, что в изучаемой группе женщин генетические варианты А rs3126085 и С rs12144049 являются факторами риска развития ХИЭ (таблица 2). Выявлены ассоциации нескольких гаплотипов с возникновением заболевания, среди которых наиболее значимым является гаплотип AWGGT гапблока rs12130219-rs558269137-rs61816761-rs3126085-rs12144049 ($p_{perm}=0,001$, $OR=0,61$). Получено 11 наиболее значимых моделей SNP×SNP взаимодействий, связанных с ХИЭ, в состав которых включены 8 из 10 рассматриваемых SNPs. В наибольшее число моделей входят полиморфные локусы rs12144049 (10 моделей), rs10888499 (7 моделей). В исследуемой группе мужчин с развитием ХИЭ ассоциированы лишь две четырехлокусные модели, в состав которых включены 6 из 10 анализируемых SNPs.

Таким образом, ассоциации полиморфных локусов гена *FLG* с развитием хронической истинной экземы имеют пол-специфические особенности: у женщин вклад полиморфизма гена *FLG* в подверженность к заболеванию более выражен в сравнении с мужчинами.

Функциональное значение полиморфных локусов гена *FLG*, ассоциированных с развитием хронической истинной экземы

Среди 10 SNPs, ассоциированных с ХИЭ, 2 полиморфизма связаны с потерей функции белка филаггрина (loss-of-function variants): rs558269137 (2282delACTG) (frameshift variant) и rs61816761 (R501X) (stop gained). Установлено, что с rs3126085, вовлеченного в развитие ХИЭ сильно сцеплены ($r^2 \geq 0,80$) 21 nsSNPs, 12 из которых имеют важное предикторное значение («deleterious», «probably damaging», «possibly damaging»).

По данным базы HaploReg (v4.1) установлено, что все 10 ХИЭ - ассоциированных SNPs и 130 SNPs, сильно сцепленных с ними ($r^2 \geq 0,80$), имеют значимый регуляторный потенциал (расположены в области гистонов, маркирующих промоторы и энхансеры, регионе гиперчувствительности к ДНКазе-1, регионе мотивов ДНК, эволюционно консервативных регионах) и могут проявлять эпигенетические эффекты по отношению к рядом расположенным с ними 10 генам – *LCE1E*, *SPRR3*, *HRNR*, *RP1-91G5.3*, *LCE5A*, *SNORA31*, *LCE3E*, *FLG*, *FLG-AS1*.

Установлено, что 10 рассматриваемых нами локусов гена *FLG* и сильно сцепленные с ними 116 SNPs ($r^2 \geq 0,80$) связаны с экспрессией 34 генов в различных органах и тканях организма (*AL591893.1*, *CELF3*, *CHTOP*, *CRCT1*, *CRNN*, *FLG*, *FLG2*, *FLG-AS1*, *HRNR*, *LCE1D*, *LCE1E*, *LCE3A*, *LCE3C*, *LCE3D*, *LCE5A*, *LINGO4*, *MRPL9*, *RP11-107M16.2*, *RP1-20N18.10*, *RP1-20N18.4*, *RP1-91G5.3*, *S100A12*, *S100A8*, *SELENBP1*, *SMCP*, *SNX27*, *SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR2B*, *SPRR2D*, *SPRR2F*, *SPRR3*, *TCHH*, *THEM4*). При этом важно подчеркнуть, что 8 изучаемых в данной работе SNPs и более 100 SNPs, находящихся с ними в неравновесии по сцеплению ($r^2 \geq 0,80$), влияют на транскрипцию 17 генов в коже (*CRCT1*, *CRNN*, *FLG*, *FLG2*, *FLG-AS1*, *HRNR*, *LCE1D*, *LCE1E*, *LCE3A*, *LCE3C*, *LINGO4*, *RP1-91G5.3*, *SPRR1A*, *SPRR1B*, *SPRR2B*, *SPRR2D*, *SPRR3*).

Таблица 2

Ассоциации полиморфных локусов гена *FLG* с развитием ХИЭ у женщин и мужчин

SNP	MAF	n	аддитивная модель				доминантная модель				рецессивная модель				
			OR	95%CI		P	OR	95%CI		P	OR	95%CI		P	
				L95	U95			L95	U95			L95	U95		
женщины (n=453)	rs12130219	G	446	0,96	0,71	1,30	0,782	1,05	0,72	1,54	0,792	0,61	0,27	1,34	0,216
	rs558269137	delACTG	446	2,02	0,80	5,04	0,135	2,02	0,80	5,04	0,135	NA	NA	NA	NA
	rs6661961	T	448	0,99	0,76	1,27	0,917	0,92	0,62	0,98	0,665	1,09	0,68	1,75	0,734
	rs3126085	A	443	1,60	1,07	2,38	0,021	1,74	1,10	2,77	0,019	1,86	0,55	6,27	0,318
	rs12144049	C	431	1,71	1,19	2,46	0,004	1,76	1,18	2,63	0,006	2,82	0,75	10,64	0,127
	rs61816761	A	449	4,59	0,53	39,59	0,166	4,59	0,53	39,59	0,166	NA	NA	NA	NA
	rs471144	G	436	1,23	0,75	2,02	0,408	1,12	0,65	1,91	0,684	0,01	0,00	inf	0,999
	rs10888499	C	448	0,84	0,62	1,14	0,271	0,68	0,47	1,00	0,047	1,69	0,76	3,75	0,197
	rs77199844	delAT	442	0,83	0,46	1,50	0,532	0,83	0,46	1,50	0,532	NA	NA	NA	NA
	rs4363385	T	436	0,95	0,73	1,24	0,691	0,81	0,54	1,22	0,313	1,13	0,70	1,82	0,624
мужчины (n=203)	rs12130219	G	199	1,35	0,84	2,17	0,217	1,56	0,88	2,75	0,128	0,96	0,28	3,27	0,952
	rs558269137	delACTG	194	0,77	0,22	2,78	0,695	0,77	0,22	2,78	0,695	NA	NA	NA	NA
	rs6661961	T	199	1,09	0,73	1,61	0,688	1,39	0,78	2,47	0,259	0,75	0,35	1,61	0,466
	rs3126085	A	198	1,96	0,99	3,88	0,054	1,88	0,91	3,92	0,090	0,01	0,00	inf	0,999
	rs12144049	C	191	1,13	0,68	1,86	0,645	1,42	0,76	2,65	0,275	0,49	0,13	1,80	0,282
	rs61816761	A	198	0,01	0,00	inf	0,999	0,01	0,00	inf	0,999	NA	NA	NA	NA
	rs471144	G	202	0,66	0,29	1,50	0,317	0,69	0,29	1,65	0,406	0,01	0,00	inf	0,999
	rs10888499	C	199	0,78	0,51	1,22	0,276	0,73	0,42	1,29	0,280	0,74	0,26	2,05	0,557
	rs77199844	delAT	201	1,54	0,67	3,54	0,309	1,54	0,67	3,54	0,309	NA	NA	NA	NA
	rs4363385	T	196	1,05	0,70	1,55	0,821	1,05	0,58	1,89	0,871	1,09	0,52	2,27	0,828

Примечание: Результаты получены с учетом коррекции на ковариаты; MAF – минорный аллель; OR – отношение шансов, 95%CI – 95% доверительный интервал, L95 – нижняя граница, U95 – верхняя граница 95% доверительного интервала; P – уровень статистической значимости (жирным выделены статистически значимые результаты с учетом адаптивного пермутационного теста), NA – не определяется.

В работе получено, что 10 анализируемых нами локусов гена *FLG* и 28 SNPs, сильно сцепленных с ними, ассоциированы с уровнем альтернативного сплайсинга транскриптов 4 генов (*RP1-20N18.10*, *RP11-107M16.2*, *SPRR3*, *CRNN*) в различных органах и тканях.

Таким образом, нами установлено 38 генов-кандидатов, вовлеченных в формирование ХИЭ через регуляторные, eQTL и sQTL эффекты 10 изученных в данной работе полиморфных локусов гена *FLG* и 130 сильно сцепленных с ними SNPs. Среди биологических путей (по данным Gene Ontology), характеризующих функциональное значение этих 38 генов-кандидатов, сверхпредставительство имеют следующие: развитие кожи (Fold Enrichment – 29,15, $p_{FDR}=9,10 \times 10^{-18}$) и формирование кожного барьера (Fold Enrichment – 81,45, $p_{FDR}=0,011$), дифференцировка кератиноцитов (Fold Enrichment – 38,90, $p_{FDR}=3,53 \times 10^{-18}$) и кератинизация (Fold Enrichment – 46,13, $p_{FDR}=5,20 \times 10^{-19}$), регулирование водного обмена в коже (Fold Enrichment – 72,40, $p_{FDR}=0,013$), запрограммированная гибель клеток (Fold Enrichment – 6,91, $p_{FDR}=0,0004$), процессы, опосредованные кальций-связывающими белками (Fold Enrichment – 35,80, $p_{FDR}=0,00003$) и в том числе кальмодулином (Fold Enrichment – 45,25, $p_{FDR}=0,00002$). Следует подчеркнуть, что значимая роль такого биологического пути как дифференцировка кератиноцитов в формировании ХИЭ показана и в ранее проведенном полногеномном исследовании Vaurecht H. et al. (2015).

Установлена генетическая сеть взаимодействия генов-кандидатов ХИЭ (рисунок 3), которая осуществляется через общие белковые домены (52,36%), ко-экспрессию (41,79%), ко-локализацию (3,87%) и предикторные взаимодействия (1,98%).

Выводы

1. Полиморфные локусы rs12130219, rs558269137, rs61816761, rs3126085, rs12144049, rs6661961, rs471144, rs10888499, rs77199844, rs4363385 гена *FLG* вовлечены в формирование хронической истинной экземы у жителей Центрального Черноземья России.

2. Аллель А rs3126085 является фактором риска развития хронической истинной экземы (OR=1,69-1,79), повышает афинность к транскрипционным факторам Foxp3, TEF и снижает экспрессию гена *FLG* в коже. Полиморфный вариант С rs12144049 ассоциирован с повышенным риском развития заболевания (OR=1,45-1,63), влияет на афинность к факторам транскрипции Irf, Obox6, ZEB1 и связан с высокой экспрессией гена *CRNN* в коже.

3. Гаплотип delGGC гапблока rs558269137-rs61816761-rs3126085-rs12144049 гена *FLG* более чем в 8 раз повышает риск развития хронической истинной экземы (OR=8,16), а гаплотип WGGT имеет протективное значение при возникновении заболевания (OR=0,62).

4. В формирование хронической истинной экземы вовлечены 10 наиболее значимых моделей SNP x SNP взаимодействий 7 полиморфных локусов гена *FLG* ($p_{perm} \leq 0,001$). В состав наибольшего количества моделей входят полиморфные локусы rs12144049 (10 моделей) и rs12130219 (7 моделей).

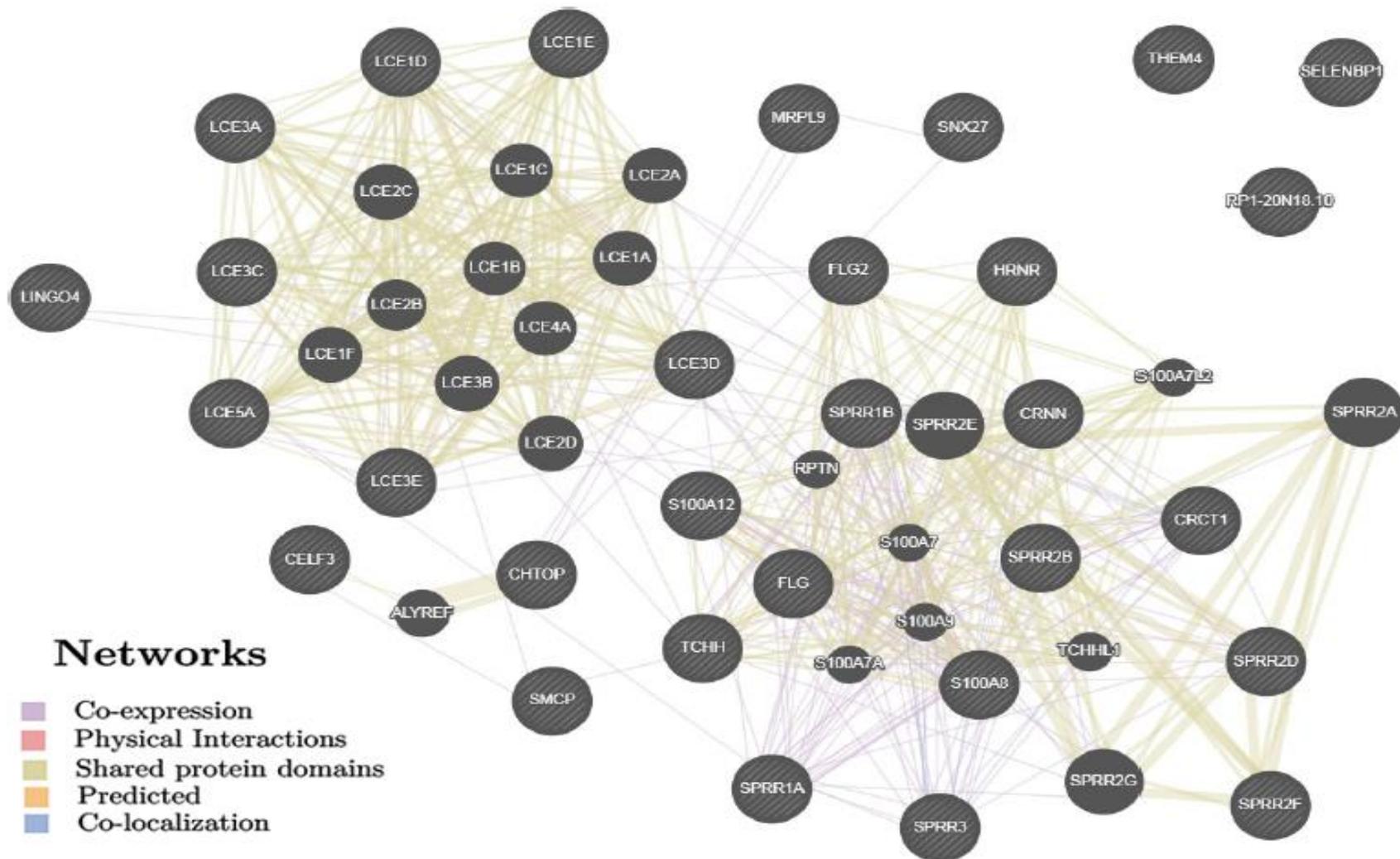


Рисунок 3. Сети взаимодействия генов-кандидатов, связанных с формированием ХИЭ (получены с помощью он-лайн программы GeneMANIA (<http://genemania.org>)) (штриховкой указаны гены, ассоциированные с развитием ХИЭ по данным нашего исследования).

5. Ассоциации полиморфных локусов гена *FLG* с развитием хронической истинной экземы имеют пол-специфические особенности: у женщин вклад полиморфизма в подверженность к заболеванию более выражен в сравнении с мужчинами.

6. Полиморфизм гена *FLG* (10 изученных полиморфных локусов и 130 сильно сцепленные с ними SNPs) определяет вовлеченность в формирование хронической истинной экземы 38 генов-кандидатов и следующих биологических путей ($p_{FDR} < 0,05$): дифференцировка кератиноцитов и кератинизация, развитие эпидермиса, формирование кожного барьера и регулирование водного обмена в коже, процессы, опосредованные кальций-связывающими белками и в том числе кальмодулином, запрограммированная гибель клеток.

Практические рекомендации

1. При профилактических осмотрах клинически здоровых индивидуумов для формирования среди них групп повышенного риска развития экземы рекомендуется проводить тестирование полиморфных локусов rs3126085 и rs12144049 гена *FLG*.

2. В качестве маркера высокого риска возникновения заболевания рекомендуется использовать гаплотип delGGC гапблока rs558269137-rs61816761-rs3126085-rs12144049 гена *FLG*.

3. У женщин, для оценки риска развития ХИЭ, предлагается использовать генетические варианты А rs3126085 и С rs12144049 (факторы риска) и гаплотип AWGGT полиморфных локусов rs12130219-rs558269137-rs61816761-rs3126085-rs12144049 (протективный фактор).

4. Для индивидуального прогнозирования риска развития ХИЭ у мужчин рекомендуется использовать протективную комбинацию генотипов rs12130219 AA x rs77199844 WW x rs12144049 TT x rs3126085 GG.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Беляева, Т.М.** Роль взаимодействия полиморфных локусов гена *FLG* в формировании хронической истинной экземы у женщин / Т.М. Беляева // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2019. – Т. 5, вып. 4. – С. 5–18.

2. **Беляева, Т.М.** Изучение ассоциаций гаплотипов полиморфизма гена *FLG* с развитием хронической истинной экземы у мужчин / Т.М. Беляева // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2020. – Т. 6, вып. 2. – С. – 160-171.

3. **Belyaeva, T.** Dataset of allele, genotype and haplotype frequencies of four polymorphisms filaggrin gene in Russian patients with atopic dermatitis / Belyaeva T., Ponomarenko I., Reshetnikov E. [et al.] // Data Brief. – 2020. – Vol. 29. – 105307. (**Web of Science, Scopus**)

Публикации в других изданиях:

4. Бибичева, Т.В. Стационар дерматологического профиля: частые нозологические формы и возрастная структура пациентов (2010-2013 гг) / Т.В. Бибичева, Ю.В. Гашенина, **Т.М. Беляева** [и др.] // «Инновации в медицине» материалы шестой международной дистанционной научной конференции посвященной 80-летию Курского государственного

медицинского университета / КГМУ, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Общерос. общест. организация «Рос. союз молодых ученых»; под ред. проф. В.А. Лазаренко, доц. П.В. Ткаченко. – Курск, 2014. – С. 24-26.

5. **Беляева, Т.М.** К вопросу о факторах риска развития хронической истинной экземы / Т.М. Беляева, А.В. Елыкова // Актуальные вопросы совершенствования медицинской помощи и профессионального медицинского образования: сборник тезисов медицинского форума, г. Белгород, 13–14 марта 2019 г. / ИД «Белгород» НИУ «БелГУ»; под ред. В.Ф. Куликовского, О.А. Ефремовой. – Белгород, 2019. – С. 10.

6. **Беляева, Т.М.** Изучение взаимосвязи гена филаггрина (rs 4363385) с формированием хронической истинной экземы / Т.М. Беляева // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези доповідей II Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, 21 листопада 2019 р. / НФаУ. – Харків, 2019. – С. 73.

7. **Беляева, Т.М.** Полиморфизм rs 10888499 гена *FLG* и хроническая истинная экзема / Т.М. Беляева // Актуальные вопросы совершенствования медицинской помощи и профессионального медицинского образования: сборник тезисов V Междисциплинарного медицинского форума с международным участием, г. Белгород, 11–12 марта 2020 г. / ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ»; под ред. В.Ф. Куликовского, О.А. Ефремовой. – Белгород, 2020. – С. 24.

8. **Беляева, Т.М.** Ассоциации полиморфизма гена филаггрина с развитием хронической истинной экземы / Т.М. Беляева // Актуальные проблемы биомедицины – 2020: сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г. / РИЦ ПСПбГМУ; отв. ред. Т.Д. Власов. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 404–405.

9. **Беляева, Т.М.** Оценка двухлокусных моделей межгенных взаимодействий, вовлеченных в развитие хронической истинной экземы / Т.М. Беляева // Университетская наука: взгляд в будущее: сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета (7 февраля 2020 года) : в 2 т. / Курский гос. мед. ун-т; под ред. В.А. Лазаренко. – Курск, 2020. Т. II. – С. 540–544.

10. **Беляева, Т.М.** Вклад взаимодействия полиморфных локусов гена *FLG* в формирование хронической истинной экземы / Т.М. Беляева // Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : тези доповідей II Науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, 15 травня 2020 р. / НФаУ. – Харків, 2020. – С. 33.

Список сокращений

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ХИЭ – хроническая истинная экзема

FDR – частота ложноположительных результатов

FLG – филаггрин

GWAS – полно-геномные исследования

SNP – однонуклеотидный полиморфизм