

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

САДОВНИЧЕНКО ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



УДК: 575.22:616.5-003.871

ГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ІХТІОЗУ У ХАРКІВСЬКІЙ ОБЛАСТІ

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертація є рукописом.

Роботу виконано на кафедрі акушерства та гінекології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Федота Олена Михайлівна,
Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна,
професор кафедри акушерства та гінекології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Панчук Ірина Ігорівна,
Чернівецький національний університет імені Юрія
Федьковича, професор кафедри молекулярної генетики
та біотехнології

кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник


Скрипкіна Інесса Яківна,
Інститут молекулярної біології і генетики Національної
академії наук України, завідувач лабораторії біосинтезу
нуклеїнових кислот

Захист відбудеться 8 вересня 2021 року об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.
Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано «___» серпня 2021 року

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доцент

 Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. У різних регіонах України вивчено поліморфізм генів, що зумовлюють розвиток низки генетичних патологій, у тому числі порушень обміну речовин, кістково-м'язової та ендокринної систем, генодерматозів, а також цитогенетичні варіанти хромосомних захворювань (Рыжко и др., 2009; Макух, Гнатейко, 2013; Дмитрук та ін., 2016; Arbuzova et al., 2016; Chernushyn, Livshits, 2016; Пічкур и др., 2017; Kravchenko et al., 2017; Tkach et al., 2017; Zelinska et al., 2018). Популяційно-генетичні дослідження моногенних хвороб проводилися на заході та сході держави, у тому числі у ядрі історико-етнокультурного краю Слобожанщина — Харківській області (Пацкун, 2008; Федота, 2012; Макух, Гнатейко, 2013). На величину тягаря генетичної патології населення значний вплив спричинює рівень інбридингу, тому зіставлення молекулярно-генетичних характеристик генетичної патології з генетико-демографічними параметрами населення кожної області є актуальним, особливо в умовах стабільного зниження аутбредного компонента у сільській місцевості (Atramentova et al., 2004).

Останнім часом молекулярний інструментарій широко застосовується як у діагностиці та профілактиці спадкових захворювань, так і в аналізі популяційно-генетичних процесів (Hahn, 2018; Collins et al., 2021). Традиційні способи визначення ступеня інбридингу є доцільними як підґрунтя розвитку проектів для його оцінки із застосуванням результатів молекулярно-генетичного тестування здорового населення та осіб з генетичними патологіями. Оптимальним у таких дослідженнях є урахування показників не тільки генетичного тягаря популяцій в цілому, а й окремих хромосомних та моногенних захворювань, у тому числі генодерматозів.

Моногенний дерматоз іхтіоз належить до хвороб людини, що призводять до зниження якості життя, інвалідизації і соціальної дизадаптації хворих (Mazereeuw-Nautieri et al, 2019). У структурі захворювання переважають звичайний іхтіоз (Q 80.1.0, OMIM 146700) та X-зчеплений рецесивний іхтіоз (Q 80.1 OMIM 308100) — до 1 : 250 населення та 1 : 1500 чоловіків (Brown et al., 2009; Diociaiuti et al, 2019). Звичайний іхтіоз зумовлений мутаціями гена епідермального білка філагрину (*FLG*), а X-зчеплений рецесивний — гена стероїдної сульфатази (*STS*) (Filaggrin, 2014; Takeichi, Akiyama, 2016). У різних регіонах світу спектр мутацій цих генів варіює, найбільш поширеними з них у Європі є *FLG* 2282del4 та *FLG* R501X, які характеризуються неповною пенетрантністю та варіабельною експресивністю (Filaggrin, 2014). На роль модифікатора гена *FLG* було запропоновано поліморфний варіант С677Т гена *MTHFR* (Федота, 2012). Зміни фолатного обміну пов'язані з порушенням епігенетичної регуляції експресії генів та багатьма мультифакторіальними патологіями (Stover, 2011; Mentch, Locasale, 2016; Бурденный и др., 2017), тому доцільно дослідити вплив інших генів одноуглецевого метаболізму на розвиток звичайного іхтіозу, а також їхні плейотропні ефекти.

Таким чином, генетична гетерогенність та клінічний поліморфізм іхтіозу (Takeichi, Akiyama, 2016; Vahlquist, 2018), обмеженість уявлень про модифікатори

гена *FLG* для пояснення неповної пенетрантності мутації 2282del4 у гетерозигот за нею (Filaggrin, 2014), а також відсутність відомостей про генетичні особливості Х-зчепленого рецесивного іхтіозу в Україні потребують подальшого дослідження молекулярних основ цього захворювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у рамках науково-дослідної роботи «Генетичні передумови розвитку та корекції спадкової патології на різних етапах онтогенезу людини та тварин» (номер державної реєстрації 0116U005341, 2016–2019 рр., номер держреєстрації 0119U102493, 2019–2022 рр.) Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Мета та завдання дослідження. Метою дослідження було визначення генетичних характеристик іхтіозу серед населення Харківської області.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Встановити молекулярно-цитогенетичні характеристики Х-зчепленого рецесивного іхтіозу у регіоні.
2. Визначити ефекти поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTR* та *MTRR* у хворих на звичайний іхтіоз.
3. Оцінити ризик розвитку звичайного іхтіозу у гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG* у залежності від генотипу за генами одновуглецевого обміну.
4. Проаналізувати зв'язок показників поширеності іхтіозу з коефіцієнтом випадкового інбридингу F_{ST} .
5. Вивчити показники поширеності генетичної патології у регіоні та їхній зв'язок з коефіцієнтом випадкового інбридингу F_{ST} .

Об'єкт дослідження: генетичні особливості іхтіозу, генетико-демографічні характеристики населення.

Предмет дослідження: делеції гена *STS*, поліморфні варіанти генів *MTHFR*, *MTR* та *MTRR*, показники поширеності генетичної патології, показники інбридингу, параметри генетико-демографічних процесів.

Методи дослідження. Молекулярно-цитогенетичні — флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH); молекулярно-генетичні — екстракція ДНК, ПЛР-ПДРФ-аналіз ДНК; популяційно-генетичні — визначення частот алелів та генотипів, їх відповідності закону Харді-Вайнберга, поширеності моногенної і хромосомної патології, коефіцієнту випадкового інбридингу F_{ST} , ступеня нерівноваги за зчепленням; статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. Встановлено, що Х-зчеплений рецесивний іхтіоз у пробандів зумовлений інтерстиційною делецією гена *STS* *ish del(X)(p22.31p22.31)(STS-)*. Визначено, що серед хворих на звичайний іхтіоз з генотипом 2282del4/N частота гомозигот за алелем 2756A гена *MTR* та алелем 66G гена *MTRR* у 1,4–1,6 рази вища, ніж в осіб з іншими генотипами за геном *FLG*, частота генотипу 2756AA — у 1,6 рази вища, а генотипу 66GG — у 1,8 рази нижча, ніж в осіб з мутацією 2282del4 без клінічних ознак іхтіозу. Серед хворих на іхтіоз, гетерозиготних за мутацією 2282del4, частота генотипу 2756AA у 1,6 рази вища, а генотипу 66GG — у 1,6 рази нижча, ніж у вибірці осіб з генотипом N/N. Продемонстровано, що генотип *MTHFR* 677CT/*MTHFR* 1298AA/*MTR* 2756AA/*MTRR*

66AG підвищує ризик розвитку іхтіозу в гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG* більше ніж у 11 разів.

Практичне значення отриманих результатів. Доведено доцільність визначення делеції гена *STS* у хворих на X-зчеплений рецесивний іхтіоз, а також генотипів за однонуклеотидними поліморфізмами C677T, A1298C, A2756G та A66G генів *MTHFR*, *MTR* та *MTRR* для прогнозування розвитку іхтіозу в осіб з груп ризику. Отримані популяційно-генетичні дані щодо структури і поширеності моногенної та хромосомної патології населення районів Харківської області можуть бути використані для моніторингу тягаря генетичної патології у регіоні. Результати дослідження впроваджені в освітній процес кафедри медичної біології Харківського національного медичного університету з дисципліни «Медична біологія», можуть бути рекомендовані для застосування іншим ЗВО.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником обрано тему наукового дослідження, сформульовано мету та основні завдання роботи, проведено обговорення отриманих даних. Здобувачем особисто проведено літературний пошук, виконано збір інформації, статистичний аналіз, написано дисертаційну роботу. Генетичний аналіз здійснено самостійно або за безпосередньої участі здобувача. Молекулярно-цитогенетичний аналіз проведено спільно з колегами з діагностичної лабораторії ТОВ «Медичний центр ІГР» (завідувач лабораторії — к.б.н. Гонтар Ю.В.), молекулярно-генетичний аналіз — спільно з колегами з лабораторії генетичних досліджень Інституту спадкової патології НАМН України (завідувач лабораторії — д.б.н., с.н.с. Макух Г.В.).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на науково-практичній конференції «Інноваційні технології в дерматовенерології. Міждисциплінарні зв'язки» (Харків, 2015), науково-практичній конференції «Актуальні проблеми дерматології, венерології та ВІЛ/СНІД-інфекції», присвяченій 185-річчю професора Бруєва О.М. (Харків, 2016), Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (Харків, 2017), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти», присвяченій 105-річчю пам'яті В.К. Високовича (Харків, 2017), III (X) з'їзді Української асоціації лікарів-дерматовенерологів і косметологів (Львів, 2017), European Human Genetics Conference in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics (Milan, Italy, 2018), XIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченій 100-річчю від часу заснування Національної академії наук України та 135-річчю від дня народження А.О. Сапегіна (Яремче, 2018), XV, XVI, XVII та XVIII Міжнародних наукових конференціях студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2018, 2019, 2020, 2021).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову роботу, у тому числі 8 статей, з них 3 — у виданнях, що входять до бази Scopus, та 4 — в українських фахових виданнях, 13 тез доповідей у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 5 розділів, узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та 2 додатків. Робота ілюстрована 11 таблицями та 18 рисунками. Список використаних джерел містить 337 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури представлено дані щодо молекулярних основ та концепцій патогенезу двох найбільш поширених форм іхтіозу — звичайного та Х-зчепленого рецесивного, визначено місце іхтіозу у структурі генетичної патології людини. Проаналізовано інформацію щодо SNPs генів *MTHFR*, *MTR* та *MTRR*, які контролюють ключові ланки одноуглецевого метаболізму. Схарактеризовано проблему тягаря спадкової патології населення та його зв'язку з генетичними процесами у популяціях людини. Представлено молекулярні підходи до популяційних досліджень з використанням показників генетичного поліморфізму та гаплотипної мінливості. Обґрунтовано доцільність поєднання традиційних способів вивчення рівня інбридингу з застосуванням результатів генотипування здорового населення та хворих на генетичні патології.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріали дослідження. Збір інформації проведений у КНП «Обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер №1», КНП «Балаклійська центральна клінічна районна лікарня», КНП «Вовчанська центральна районна лікарня», КНП «Зміївська центральна районна лікарня», КНП «Красноградська центральна районна лікарня», районних шкірно-венерологічних диспансерах протягом 2015–2020 рр. Дані щодо генетичної патології населення зібрано шляхом вивчення знеособлених медичних записів — реєстрів орфанних захворювань, груп диспансерного обліку тощо. Інформацію, необхідну для розрахунків популяційно-генетичних показників, отримано за запитом з державних органів та органів місцевого самоврядування — розпорядників інформації.

Проаналізовано дані про 249 хворих на дві основні форми іхтіозу — звичайний та Х-зчеплений рецесивний, їхніх родичів 1–5-го ступенів спорідненості з Харківської області, яка знаходиться у центрі Слобожанщини, про 662 хворих з моногенною, хромосомною, мультифакторіальною патологією та вродженими вадами розвитку, про 1582 шлюбні пари з чотирьох районів Харківщини — Балаклійського, Вовчанського, Зміївського та Красноградського. Проведено молекулярно-цитогенетичний аналіз для 11 осіб з Х-зчепленим рецесивним іхтіозом та їхніх матерів без клінічних ознак хвороби, молекулярно-генетичний аналіз — для 38 осіб зі звичайним іхтіозом та їхніх родичів без клінічних ознак іхтіозу.

Дослідження виконано відповідно до основних біоетичних норм Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення науково-медичних досліджень (2000, з поправками 2008), Універсальної декларації з біоетики та прав людини (1997), Конвенції Ради Європи з прав людини та біомедицини (1997).

Методи дослідження. Молекулярно-цитогенетичний аналіз проведено за методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) з використанням зондів для стероїдної сульфатази (*STS*), синдрому Каллмана (*KALI*) та центромери X-хромосоми (*DXZ1*) (Lichter, Ried, 1994; Ворсанова и др., 1999; Зерова-Любимова, Горовенко, 2003).

Молекулярно-генетичний аналіз для встановлення генотипів хворих на іхтіоз звичайний та їхніх родичів 1-го ступеня спорідненості за SNPs C677T (rs1801133) та A1298C (rs1801131) гена 5,10-метилентетрагідрофолатредуктази (*MTHFR*), A2756G (rs1805087) гена 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн S-метилтрансферази (*MTR*) та A66G (rs1801394) гена метіонінсинтази редуктази (*MTRR*), а також за мутаціями R501X (rs61816761) та 2282del4 (rs558269137) гена філагрину (*FLG*) виконано методом полімеразної ланцюгової реакції та аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) (Frosst et al., 1995; van der Put et al., 1998; Wilson et al., 1999; Matsuo et al., 2001; Blanchard et al., 2010; Чорна та ін., 2011).

Популяційно-генетичний аналіз здійснено з визначенням частот алелів та генотипів, їх відповідності закону Харді-Вайнберга, поширеності моногенної та хромосомної патології, середнього віку, дальності міграції, шлюбної відстані, коефіцієнту випадкового інбридингу F_{ST} , коефіцієнту добору, ступеня нерівноваги за зчепленням за показниками D' та r^2 (Фогель, Мотульські, 1990; Животовський, 1991; Алтухов, 2004; Ельчинова, 2004; Relethford, 2012; Cavalli-Sforza, Bodmer, 2013). Аналіз даних літератури щодо частот алелів та генотипів за генами *FLG* та фолатного обміну, а також рівня гомоцистеїну у плазмі крові серед населення країн Європи проведено із застосуванням відповідних показників.

Статистичний аналіз проведено з перевіркою даних на відповідність закономірностям нормального розподілу за критеріями Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Перевірку середніх арифметичних у попарних порівняннях здійснено за критеріями Манна-Уїтні, Стьюдента та Вілкоксона, а у множинних — за критерієм Крускала-Уолліса. Різницю частот оцінено за допомогою ф-перетворення Фішера шляхом кутової трансформації. Зв'язок між показниками визначено за допомогою кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірменом. Статистичні гіпотези перевірено за критеріями t та χ^2 . Відносний ризик і довірчий інтервал розраховані за Р. Armitage з співавт. При проведенні множинних порівнянь уведено поправку Бонфероні (Armitage, Berry, 2001; Атраментова, Утєвська, 2007). Обчислення проведено з використанням програм Statistica Basic Academic (версія 13.3, TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA, № ліцензії STTS19329246) та Naploview (версія 4.2, Broad Institute, USA).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генетичні особливості X-зчепленого іхтіозу. X-зчеплений іхтіоз зумовлений точковими мутаціями, делеціями гена *STS* або транслокаціями цього та сусідніх регіонів на аутосомі (de Vries et al., 1999; Elias et al., 2014; Toral-Lopez et al., 2015). Проведений аналіз дев'яти родин з клінічними ознаками X-зчепленого рецесивного іхтіозу, які включали 169 осіб, виявив 59 хворих чоловіків — родичів 1-5 ступенів спорідненості.

Молекулярно-цитогенетичне дослідження показало, що у семи пацієнтів чоловічої статі з X-зчепленим рецесивним іхтіозом та двох матерів хворих чоловіків з восьми родин наявна інтерстиційна делеція гена *STS* — *ish del(X)(p22.31p22.31)(STS-)* (рис. 1). Делеції гена *STS* є характерними для 85–90% хворих на цю форму іхтіозу у світі (Diociaiuti et al., 2019).

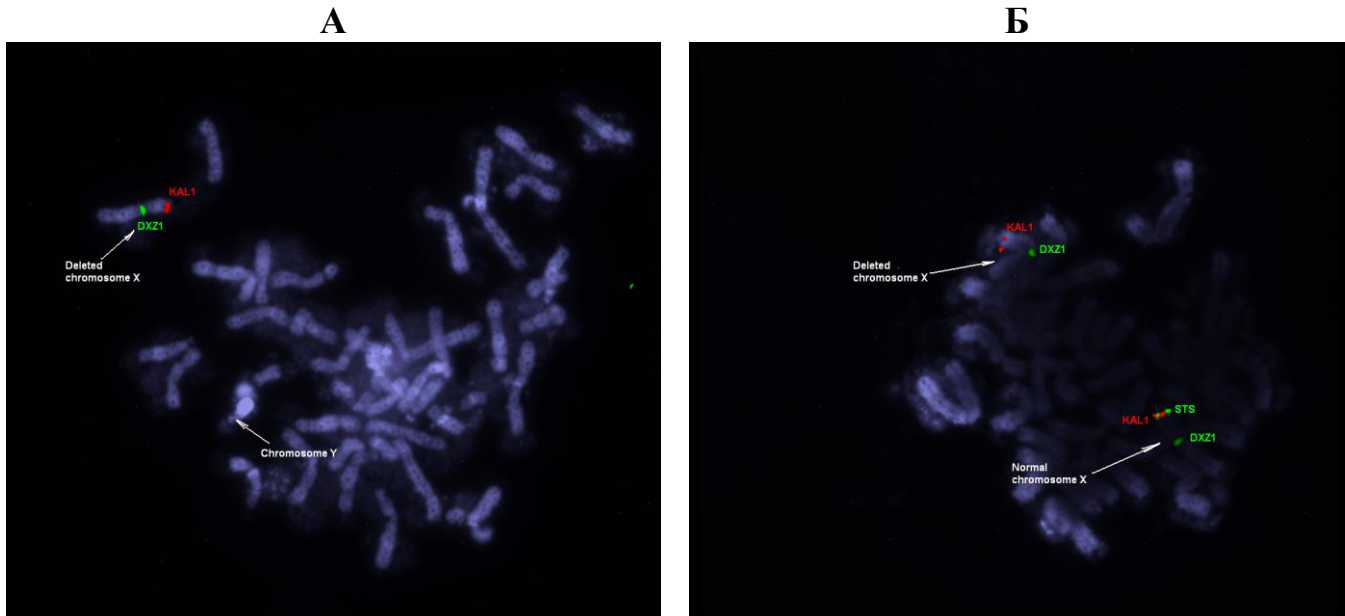


Рис. 1. Каріотиби осіб з виявленою інтерстиційною делецією X-хромосоми *ish del(X)(p22.31p22.31)(STS-)*, x1000: чоловіка (А), жінки (Б)

За даними літератури, дефіцит стероїдної сульфатази у плаценті жінок, гетерозиготних за мутаціями гена *STS*, може послаблювати пологову діяльність, що асоційоване з високим рівнем ускладнень з боку матері та плоду, а також перинатальними втратами (Elias et al., 2014; Татарчук, 2015). Однак в облігатних гетерозигот середня кількість дітей на жінку становила 2,3, а у середньому по області, за даними Державної служби статистики, — 1,4 ($p = 0,011$), отже рівень фертильності в них не знижений. Співвідношення чоловічої та жіночої статей серед нащадків гетерозиготних жінок становить 1:1. Більша кількість дітей у гетерозиготних жінок може бути зумовлена феноменом переваги гетерозигот за рецесивними патологічними алелями (Hedrick, 2012). Зниження ризику розвитку гормонзалежних пухлин у таких жінок може зумовлювати подовження тривалості здорового життя та, ймовірно, підвищувати еволюційну пристосованість їхніх родин внаслідок «ефекту бабусі» (Friederike Kachel et al., 2011; Rižner, 2016).

У чоловіків з X-зчепленим іхтіозом середня кількість дітей є меншою у порівнянні з родичами без ознак захворювання — 0,9 та 2,3 відповідно ($p = 0,014$). У нащадків чоловіків, хворих на іхтіоз, спостерігалось відхилення співвідношення статей у потомстві на користь жіночої — 3:1 ($p = 0,045$), тоді як у інших членів родин без клінічних ознак патології співвідношення наближалось до 1:1. Коефіцієнт пристосованості у чоловіків з цією формою іхтіозу дорівнював 0,56, а коефіцієнт добору проти гемізіготного генотипу — 0,44. Отже, особливості репродукційної функції у хворих на іхтіоз могли бути зумовлені змінами

гаметогенезу в цілому внаслідок порушення частоти рекомбінаційних процесів між хромосомами (Ren et al., 2016; Faisal, Kauppi, 2015) та зниженням життєздатності Y-сперматозоїдів.

Генетичні особливості іхтіозу звичайного у Харківській області. У вибірці осіб зі звичайним іхтіозом, раніше дослідженій нашими колегами, пенетрантність мутацій гена *FLG* у гомозигот становила 100%, у гетерозигот — 67%, пенетрантність мутації R501X — 100%, а мутації 2282del4 — 84,2%, що зіставне з даними по більшості європейських країн (Filaggrin, 2014; Gruber et al., 2007; Palmer et al., 2006; Smith et al., 2006; Федота, 2012). У якості модифікаторів гена *FLG* для визначення ризику розвитку звичайного іхтіозу нами було розглянуто SNPs генів фолатного обміну *MTHFR*, *MTR* та *MTRR*.

Проведений за даними літератури аналіз географічних особливостей розподілу частот алелів та генотипів за одонуклеотидними поліморфізмами C677T та A1298C гена *MTHFR*, A2756G гена *MTR* та A66G гена *MTRR* у північній півкулі виявив зв'язок показників широтної зональності з частотами генотипів 677CT ($r = -0,721$, $p = 0,019$), 66AG ($r = -0,652$, $p = 0,041$) та алеля 677T ($r = -0,648$, $p = 0,043$) (табл. 1).

Вивчення розподілу частот генотипів та алелів за мутаціями гена *FLG* та поліморфними варіантами генів одновуглецевого метаболізму показало наявність зворотних зв'язків між частотами генотипів 2282del4/N та 677CT ($r = -0,903$, $p = 0,0003$), генотипу 2282del4/N та алеля 677T ($r = -0,673$, $p = 0,033$), алеля 2282del4 та генотипу 677CT ($r = -0,926$, $p = 0,00012$), алелів 2282del4 та 677T ($r = -0,755$, $p = 0,012$). Отже, продемонстровані особливості широтної зональності розподілу частот генотипів та алелів генів фолатного обміну та філагрину у країнах Європи, ймовірно, можуть лежати в основі формування їхніх асоціацій з певними ознаками.

Молекулярно-генетичне дослідження генів фолатного обміну проведене для 31 особи зі звичайним іхтіозом та 7 їхніх родичів 1-го ступеня спорідненості. Приклади результатів генотипування наведено на рис. 2–4.

У хворих з генотипами 2282del4/2282del4, R501X/2282del4, R501X/N за геном *FLG* частоти алелів за SNP *MTHFR* C677T склали 0,57 : 0,43; *MTHFR* A1298C — 0,75 : 0,25; *MTR* A2756G — 0,71 : 0,29; *MTR* A66G — 0,61 : 0,39. У гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG*, хворих на іхтіоз, частоти алелів за SNP *MTHFR* C677T становили 0,65 : 0,35; *MTHFR* A1298C — 0,77 : 0,24; *MTR* A2756G — 0,84 : 0,16; *MTR* A66G — 0,50 : 0,50. У порівнянні з хворими з іншими генотипами за геном *FLG* частота алеля 2756G у них у 1,8 рази нижча ($p < 0,001$). У вибірці осіб з генотипом 2282del4/N без клінічних ознак іхтіозу частоти алелів за SNP *MTHFR* C677T склали 0,71 : 0,29; *MTHFR* A1298C — 0,64 : 0,36; *MTR* A2756G — 0,71 : 0,29; *MTR* A66G — 0,29 : 0,71. У порівнянні з хворими з таким же генотипом за геном *FLG* частота алелів 1298C, 2756G та 66G в них у 1,4–1,8 рази вища ($p < 0,05$), а порівняно до показників осіб з генотипами N/N за геном *FLG* без клінічних ознак іхтіозу (Чорна та ін., 2011) частота алеля 66G вища у 1,6 рази ($p < 0,001$).

Аналіз розподілу частот генотипів та алелів поліморфних варіантів C677T та A1298C гена *MTHFR*, A2756G гена *MTR* та A66G гена *MTRR* у хворих на іхтіоз звичайний та їхніх родичів показав, що відхилення їх відношення від рівноваги Харді-Вайнберга відзначено за поліморфним варіантом C677T гена *MTHFR* (рис. 5).

Частоти алелів та генотипів за генами фолатного обміну серед населення європейських країн, %

Країна	Поліморфні варіанти генів фолатного обміну																				Джерела
	<i>MTHFR</i>										<i>MTR</i>					<i>MTRR</i>					
	<i>C677T</i>					<i>A1298C</i>					<i>A2756G</i>					<i>A66G</i>					
	генотип			алель		генотип			алель		генотип			алель		генотип			алель		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	
Шотландія	48,7	41,4	9,9	69,4	30,6	46,5	43,3	10,2	68,2	31,9	65,5	31,5	3,0	81,3	18,7	19,6	47,8	32,6	43,5	56,5	(Yu et al., 2004; Theodoratou et al., 2008)
Данія	50,3	41,4	8,3	71,0	29,0	46,0	41,3	12,7	66,7	33,3	62,6	33,5	3,9	79,3	20,7	37,6	43,2	19,3	59,2	40,9	(Bathum et al., 2007; Bethke et al., 2008; Kokotas et al., 2009)
Англія	46,2	42,7	11,1	67,6	32,4	47,8	40,2	12,0	67,9	32,1	63,8	32,3	3,9	80,0	20,0	37,1	47,2	15,6	60,8	39,3	(Relton et al., 2004; Bethke et al., 2008)
Ірландія	46,4	43,6	10,0	68,2	31,8	49,4	41,8	8,8	70,3	29,7	63,7	32,0	4,3	79,7	20,3	37,4	46,6	16,0	60,7	39,3	(O'Leary et al., 2004; Mills et al., 2008; Bush et al., 2016)
Польща	49,5	42,8	7,8	70,9	29,2	43,7	46,2	10,0	66,9	33,2	65,8	30,8	3,3	81,3	18,8	27,5	46,7	25,8	50,8	49,2	(Seremak-Mrozikiewicz et al., 2013; Seremak-Mrozikiewicz et al., 2017)
Німеччина	48,7	40,8	10,6	69,0	31,0	50,0	42,0	8,0	71,0	29,0	62,3	34,0	3,8	79,3	20,8	17,7	53,6	28,8	44,4	55,6	(Kloss et al., 2006; Gast et al., 2007; Kurzwelly et al., 2010)
Франція	37,6	52,6	9,8	63,9	36,1	51,5	40,9	7,6	72,0	28,0	66,2	30,0	3,9	81,1	18,9	28,7	50,7	20,6	54,1	46,0	(Botto, Yang, 2000; Niclot et al., 2006; Küry et al., 2008)
Австрія	43,0	43,5	13,5	64,7	35,3	48,2	41,6	10,2	69,0	31,0	—	—	—	—	—	19,8	50,3	30,0	45,0	55,1	(Födinger et al., 2000; Feix et al., 2004)
Хорватія	46,1	44,7	9,2	68,4	31,6	46,7	42,7	10,7	68,0	32,0	61,7	34,0	4,3	78,7	21,3	24,7	47,7	27,7	48,5	51,5	(Lovricevic, 2004; Jokić et al., 2011)
Італія	29,0	54,8	16,1	56,5	43,6	47,7	35,5	16,8	65,5	34,5	67,5	29,2	3,3	82,1	17,9	26,3	52,5	21,2	52,5	47,5	(Motti et al., 1998; Botto, Yang, 2000; Saccucciet al., 2008; Giusti et al., 2010)

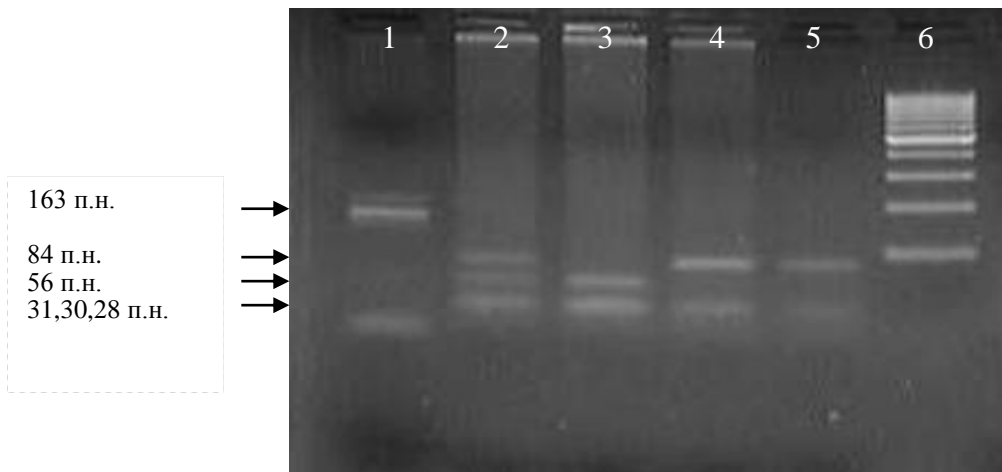


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційних фрагментів продуктів ампліфікації SNP A1298C гена *MTHFR* у агарозному гелі: алель 1298А — 56, 31, 30, 28, 18 п.н.; алель 1298С — 84, 31, 30, 18 п.н.; продукт ПЛР без рестрикції — 163 п.н. (1); генотип 1298АС (2); генотип 1298АА (3); генотип 1298СС (4, 5); маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder (6)

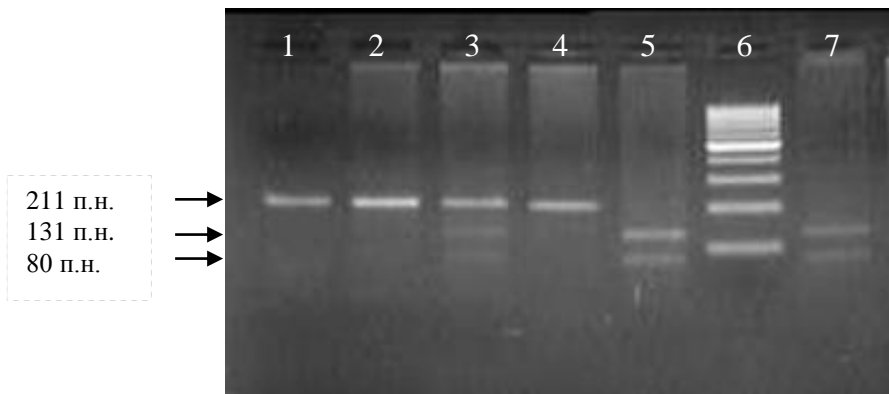


Рис. 3. Електрофореграма рестрикційних фрагментів продуктів ампліфікації SNP A2756G гена *MTR* у агарозному гелі: алель 2756А — 211 п.н.; алель 2756G — 131, 80 п.н.; генотип 2756АА (1, 2, 4); генотип 2756АG (3); генотип 2756GГ (5, 7); маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder (6)

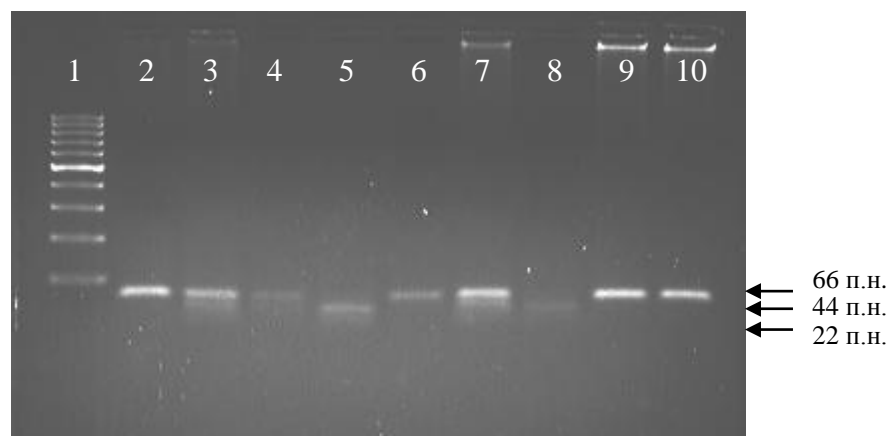


Рис. 4. Електрофореграма рестрикційних фрагментів продуктів ампліфікації SNP 66G гена *MTRR* у агарозному гелі: алель 66А — 44, 22 п.н.; алель 66G — 66 п.н.; маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder (1); генотип 66GГ (2, 6, 9, 10); генотип 66АG (3, 4, 7); генотип 66АА (5, 8)

У хворих на іхтіоз з генотипом 2282del4/N частота генотипів 2756AA та 66GG у 1,4–1,6 рази вища ($p < 0,01$), ніж у хворих з іншими генотипами за геном *FLG*, а у порівнянні з особами без клінічних ознак іхтіозу, гетерозиготними за мутацією 2282del4, частота генотипів 677CT та 2756AA у перших вища у 1,6–2,5 рази ($p < 0,001$), а генотипу 66GG — нижча у 1,8 рази ($p < 0,001$) (рис. 5).

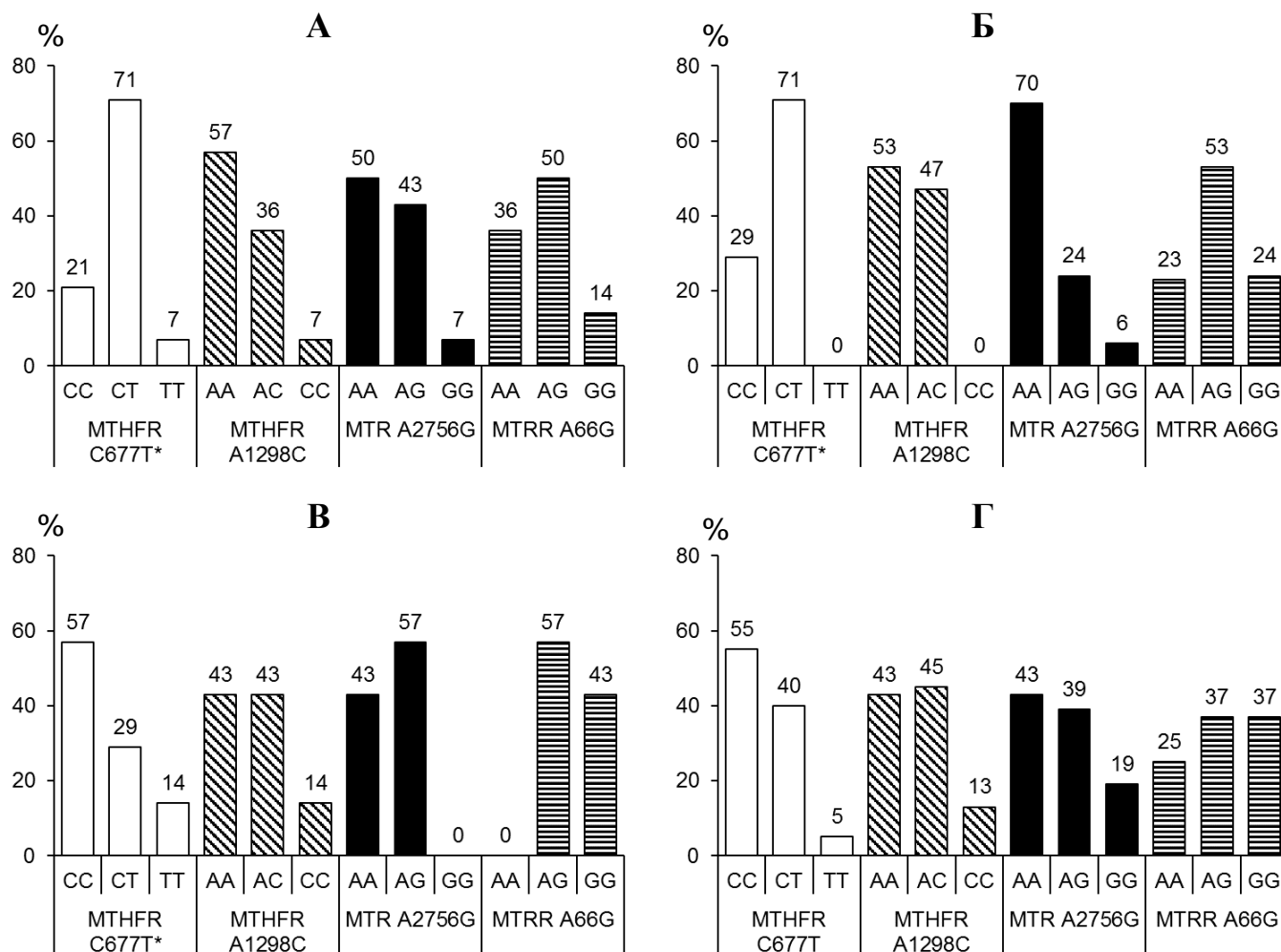


Рис. 5. Розподіл частот генотипів за генами фолатного обміну у хворих на іхтіоз та здорових носіїв мутацій гена *FLG*: хворі з генотипами 2282del4/2282del4, R501X/ 2282del4, R501X/N (А) ($n = 14$); хворі з генотипами 2282del4/N (Б) ($n = 17$); особи без клінічних ознак іхтіозу з генотипами 2282del4/N (В) ($n = 7$); особи без клінічних ознак іхтіозу з генотипами N/N (Г) ($n = 150$) (Чорна та ін., 2011); * — відхилення від теоретичного розподілу Харді-Вайнберга ($p < 0,05$)

Серед хворих на іхтіоз, гетерозиготних за мутацією 2282del4, частота генотипів 677CT та 2756AA у 1,6–1,8 рази вища, а генотипу 66GG — у 1,6 рази нижча, ніж у вибірці осіб з генотипами N/N ($p < 0,001$). Різниця у розподілі частот генотипів та алелів за генами фолатного обміну у гетерозигот за мутацією 2282del4 без клінічних ознак іхтіозу та особами з генотипами N/N знайдена за генотипами за поліморфним варіантом С677Т гена *MTHFR* (рис. 5).

Для визначення асоціації генотипів за генами одноуглецевого метаболізму з ризиком розвитку іхтіозу для гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG*

розраховано відношення шансів (OR) у межах моделей, які включали від одного до чотирьох поліморфних варіантів генів одноуглецевого метаболізму. Серед однолокусних моделей найбільший показник OR отримано для генотипу С677Т гена *MTHFR* — 3,600 (95% СІ 1,207–10,712; $p = 0,032$). За моделлю з двома однонуклеотидними поліморфізмами ризик розвитку захворювання підвищувався у понад 4,0 рази при генотипах 677СТ/1298АА+АС (OR = 4,393; 95% СІ 1,468–13,139; $p = 0,008$) та 677СТ/2756АА (OR = 4,239; 95% СІ 1,495–12,018; $p = 0,007$). Серед трилокусних моделей відношення шансів було найвищим при генотипі 677СТ/1298АА/66АГ — OR = 7,636 (95% СІ 2,338–24,943; $p = 0,001$). Максимальним ризик розвитку іхтіозу виявився в осіб з генотипом 677СТ/1298АА/2756АА/66АГ — OR = 11,231 (95% СІ 2,512–50,209; $p = 0,002$). Ймовірно, у розвитку іхтіозу в гетерозигот за мутацією *FLG* 2282del4 найбільшу роль відіграють генотипи 677СТ, 1298АА, 2756АА, 2756АГ та 66АГ.

Перевірка гіпотези проведена на прикладі оцінки популяційних параметрів звичайного іхтіозу у Великій Британії, оскільки тільки для цієї країни наведений показник поширеності іхтіозу, частоти алелів та генотипів за геном *FLG* і поліморфними варіантами генів фолатного обміну, необхідні для аналізу даних (Gaughan et al., 2001; Brown et al., 2008). Теоретично очікувана поширеність звичайного іхтіозу була розрахована нами як добуток частот генотипів 677СТ, 1298АА, 2756АА, 2756АГ та 66АГ за генами фолатного обміну — 0,092, та генотипу за мутаціями гена *FLG* у Великій Британії — 0,13 (Brown et al., 2008) і склала 0,012. Статистично значущої різниці між теоретично очікуваним та наведеним у літературі показниками поширеності іхтіозу у цій країні — 0,012 та 0,013 (Brown et al., 2009) не встановлено ($p = 0,857$). Таким чином, реалізація мутацій гена *FLG* у патологічний фенотип, ймовірно, асоційована з ефектами фолатного метаболізму, зумовленими відповідними генотипами за генами *MTHFR*, *MTR* та *MTRR*.

Гени *MTHFR* (1p36.22), *MTR* (1q43) та *FLG* (1q21.3) розташовані в одній хромосомі, для них можна очікувати нерівноваги за зчепленням та підвищення частоти предикторних генотипів. За допомогою алгоритму чотирьох гамет (Mueller, 2004) в осіб з мутацією 2282del4 визначено блоки зчеплення у генах *MTHFR* та *FLG* (рис. 6). Перший з них включав поліморфні варіанти С677Т та А1298С гена *MTHFR*, які демонстрували сильне зчеплення ($D' = 1,00$; $LOD = 2,32$; $r^2 = 0,195$). Другий утворювали слабо зчеплені мутації гена *FLG* 2282del4 та R501X ($D' = 1,00$; $LOD = 1,53$; $r^2 = 0,109$), що може бути зумовлене знаходженням мутацій гена *FLG* тільки у транс-положенні (Carlsen, 2013; Sandilands, 2009). Частота рекомбінації між блоками становила 0,31. Відсутність сильного зчеплення між знайденими блоками, ймовірно, зумовлена тим, що відстань між ними перевищує 60 кбаз (Reich, 2001).

Оскільки для поліморфних варіантів генів одноуглецевого метаболізму та мутацій гена *FLG* відомі асоціації з одними і тими ж патологіями, в тому числі атопічним дерматитом, екземою, іншими хворобами шкіри, ендокринними та гінекологічними захворюваннями, новоутвореннями тощо (Liew, Gupta, 2015; Wang et al., 2016; Zhi et al., 2016; Khaligi et al., 2018; Wan et al., 2018; Lupi-Herrera et al., 2019; Ma et al., 2019; Ren et al., 2019; Zara-Lopes et al., 2019; Zhang et al., 2020), було проведено аналіз показників репродукції у пробандів зі звичайним іхтіозом (18

жінок та 20 чоловіків). Середня кількість дітей у родинях хворих склала $1,5 \pm 0,1$, у жінок — $1,7 \pm 0,2$ дитини, у чоловіків — $1,4 \pm 0,1$, що було співставним з цим показником по Харківській області та Україні в цілому ($p = 0,954$). Співвідношення осіб чоловічої і жіночої статі серед нащадків хворих чоловіків та жінок наближалось до 1 : 1 ($p = 0,294$). Середній вік дітонородження у жінок з іхтіозом склав $24,1 \pm 1,2$ року, що свідчить про можливість реалізувати свій репродукційний потенціал у молодому віці, оскільки для них зазначено розвиток патологій, характерних для клімактеричного та перименопаузального періодів, з 27–29-річного віку.

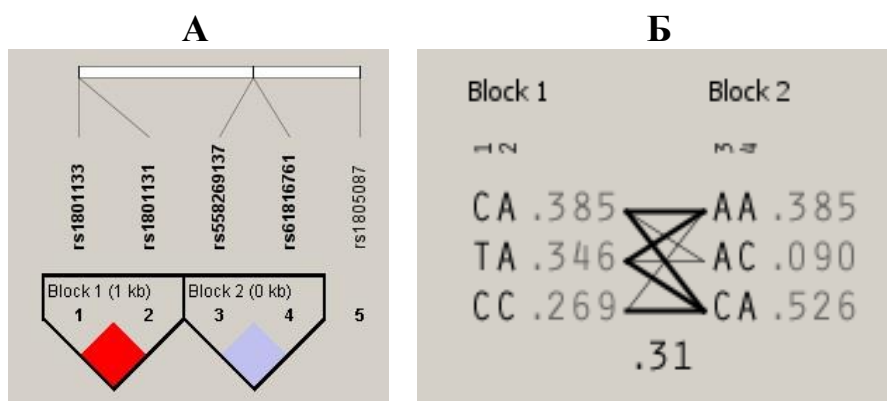


Рис. 6. Структура нерівноваги за зчепленням у 1-й хромосомі у досліджених групах: блоки зчеплення за алгоритмом чотирьох (А); блоки зчеплення та частоти гаплотипів (Б) (жирним шрифтом позначені гаплотипи, асоційовані з іхтіозом звичайним; товстими та тонкими лініями — їхні сполучення у суміжних блоках)

Аналіз популяційно-генетичних характеристик іхтіозу та іншої генетичної патології серед населення Харківської області. Оцінено показники поширеності іхтіозу в цілому та його окремих форм у 2015 р. по Харківській області. Показник поширеності іхтіозу в цілому склав $2,5 \cdot 10^{-4}$. По районах він становив від $6,7 \cdot 10^{-5}$ у Красноградському до $1,0 \cdot 10^{-3}$ у Дворічанському, а по населених пунктах — від $1,1 \cdot 10^{-4}$ у м. Вовчанську до $1,1 \cdot 10^{-3}$ у смт Дворічна. Для Х-зчепленого рецесивного іхтіозу показник поширеності у регіоні склав $1,5 \cdot 10^{-4}$ чоловіків. По районах він становив від $4,7 \cdot 10^{-5}$ у Красноградському до $4,9 \cdot 10^{-4}$ у Дворічанському, а по поселеннях — від $2,2 \cdot 10^{-4}$ у м. Краснограді до $3,7 \cdot 10^{-3}$ у одному з сіл Балаклійського району. Цей показник зіставний з західноєвропейським — $3,3\text{--}5,0 \cdot 10^{-4}$ ($p > 0,05$), однак на порядок вищий, ніж східноєвропейський — $1,1\text{--}6,4 \cdot 10^{-5}$ ($p < 0,05$) (Сукало и др., 2013; Amelina et al., 2014; Oji, 2017). Показник поширеності звичайного іхтіозу у регіоні склав $1,7 \cdot 10^{-4}$, він поступається показникам Півдня та Сходу Європи, але нижчий, ніж у Великій Британії ($p < 0,001$) (Мутевелич-Арсланагич, 1992; Сукало и др., 2013; Brown et al., 2009).

Відзначено динаміку показників поширеності іхтіозу серед населення Слобожанщини протягом останніх семи років: для іхтіозу в цілому та звичайного іхтіозу окремо вони знизилися у 1,6–1,9 рази, а для Х-зчепленого іхтіозу у більшості досліджуваних районів зросли у 1,4–4,3 ($p < 0,05$) (Федота, 2011).

Іхтіоз як моногенне захворювання є складовою тягаря генетичної патології населення, який доцільно оцінювати у контексті аналізу показників рівня

інбридингу. Тягар моногенної патології серед дітей та підлітків по районах становив 0,25–0,41%, у середньому 0,36%, а кількість нозологічних форм — 12–22. Найбільш поширеними захворювання цієї групи були нейросенсорна втрата слуху двобічна, гіпофізарний нанізм та муковісцидоз (табл. 2). У селах поширеність аутосомно-рецесивної патології серед дитячого населення у 4,3 рази вища, ніж у містах — $0,013 \pm 0,003$ та $0,003 \pm 0,001$ ($p = 0,007$). Показники поширеності моногенної патології є зіставними з такими 2008 р. — 0,53% ($p = 0,282$) (Федота, 2012).

Тягар хромосомної патології по районах становив 0,05–0,14%, у середньому 0,08%, а кількість нозологічних форм — 1–3. Найбільш поширеним захворюванням був синдром Дауна — від 1 : 1995 у Вовчанському районі до 1 : 863 у Красноградському. У Балаклійському районі поширеність синдрому Клайнфельтера становила 1 : 6991 хлопців, а синдрому Шерешевського-Тернера — 1 : 6645 дівчат. У Красноградському районі поширеність синдрому Прадера-Віллі становила 1 : 3884.

Сумарний тягар моногенної та хромосомної патології у Вовчанському районі склав 0,30%, у Зміївському — 0,37%, у Балаклійському — 0,47%, у Красноградському — 0,55%. Спектр та показники поширеності досліджених форм генетичної патології є характерними для європейських країн в цілому та України зокрема (Пацкун, 2009; Макух, 2011; Amelina, 2014; Valent et al., 2019).

На величину тягара генетичної патології населення впливає ступінь інбридингу. Молекулярні методи нині використовуються не тільки для діагностики генетичної патології, а й у популяційно-генетичних дослідженнях, тому результати молекулярно-генетичних досліджень іхтіозу дозволили підтвердити форми дослідженої патології, а також були використані для подальшої оцінки зв'язку показників поширеності досліджених нозологій та інбридингу.

Для визначення показників коефіцієнту випадкового інбридингу F_{ST} по районах регіону ми застосували такі параметри як шлюбний вік, дальність міграції та шлюбна відстань населення. Міграційні показники населення можуть відбивати генетичні відстані між популяціями, найменші з яких сприяють формуванню паттернів гомозиготності, а найбільші — порушують комплекси генів, що складають основу адаптивної генетичної структури виду (Алтухов, 2004; Ceballos et al., 2018).

Вік молодят при укладанні шлюбу, який є фактором ризику виникнення мутацій, в середньому по районах становив $27,8 \pm 0,1$ років. Чоловіки вступали до шлюбу у віці на 2,9 роки старшому, ніж жінки ($p < 0,001$). Отже, встановлений для досліджених районів середній вік батьків при народженні дитини зіставний з цим показником по Україні та регіону, укладається у рекомендовані для народження здорової дитини межі (Bewley et al., 2005) і, ймовірно, не є чинником збільшення генетичного тягара населення.

Дальність міграції та шлюбна відстань були досліджені як проміжні дані для визначення рівня гомозиготизації населення внаслідок інбридингу. Показник дальності міграції по районах становив $179,03 \pm 14,95$ км. У більшості районів цей показник для чоловіків перевищував такий для жінок у 1,2–1,6 рази ($p < 0,05$). В усіх районах 74,3 % міграцій відбувалися у межах району. Показник середньої шлюбної відстані молодят у районах дослідження склав $320,40 \pm 28,41$ км.

Коефіцієнт випадкового інбридингу F_{ST} склав 0,001292 у 2015 р., він зріс у майже у 2 рази ($p = 0,012$) за сім років (Федота, 2012). У селах рівень інбридингу є у 17,2 рази вищим, ніж у містах — $0,001498 \pm 0,000234$ та $0,000087 \pm 0,000007$ ($p = 0,0012$). Це створює передумови для зростання тягаря генетичної патології насамперед у сільській місцевості на Слобожанщині.

Таблиця 2

Показники поширеності основних моногенних захворювань серед дітей та підлітків у районах Харківської області

Патологія	ОМІМ	Район	
		Балаклійський	Вовчанський
Нейросенсорна втрата слуху	220290	1 : 974	1 : 1578
Гіпофізарний нанізм	173100, 262400	1 : 13636	1 : 2630
Муковісцидоз	219700	1 : 13636	1 : 7891
Вроджений гіпотиреоз	218700, 274900	1 : 3409	1 : 3946
Вроджена дисфункція кори надниркових залоз	201910	1 : 13636	—
Спинальна м'язова атрофія	253300, 253400, 253550	1 : 3409	1 : 7891
Синдром Елерса-Данлоса	130000	1 : 13636	1 : 7891
Іхтіоз звичайний	146700	1 : 1705	1 : 7891
Вроджена катаракта	115665, 612968	1 : 6818	—
Вроджена глаукома	231300, 600975	1 : 13636	—
Фенілкетонурія	261600	1 : 3409	1 : 3946
Глікогеноз	232200, 232300	1 : 13636	1 : 7891
Нецукровий діабет	125700, 304800	1 : 13636	—
М'язова дистрофія Дюшена	310200	1 : 6991*	—
Ектодермальна дисплазія	305100	—	1 : 7891

Примітка: * — показник розраховувався лише на осіб чоловічої статі.

Патологія	ОМІМ	Район	
		Зміївський	Красноградський
Нейросенсорна втрата слуху	220290	1 : 544	1 : 1110
Гіпофізарний нанізм	173100, 262400	1 : 2391	1 : 2589
Муковісцидоз	219700	1 : 11957	1 : 3884
Вроджений гіпотиреоз	218700, 274900	—	1 : 1942
Вроджена дисфункція кори надниркових залоз	201910	1 : 11957	1 : 7767
Спінальна м'язова атрофія	253300, 253400, 253550	1 : 5799	—
Синдром Елерса-Данлоса	130000	1 : 11957	—
Іхтіоз звичайний	146700	—	1 : 7767
Вроджена катаракта	115665, 612968	1 : 5799	1 : 7767
Вроджена глаукома	231300, 600975	1 : 11957	1 : 3884
Нецукровий діабет	125700, 304800	—	1 : 7767
М'язова дистрофія Дюшена	310200	1 : 6194*	—
Нейрофіброматоз, І тип	162200	1 : 11957	1 : 7767
Ектодермальна дисплазія	305100	—	1 : 7767

Коефіцієнти кореляції між показниками випадкового інбридингу та поширеності Х-зчепленого рецесивного іхтіозу ($r = 0,976$, $p < 0,001$), звичайного іхтіозу ($r = 0,867$, $p = 0,002$), аутосомно-рецесивної патології ($r = 0,818$, $p < 0,001$) не показали значущої різниці порівняно з даними 2008 р. (Федота, 2012).

Встановлено прямий зв'язок між показниками рівня інбридингу та поширеності хромосомної патології серед населення досліджених районів ($r = 0,904$, $p < 0,001$) (рис. 7).

Таким чином, можна припустити, що зростання показників інбридингу сприяє підвищенню тягаря не тільки моногенної патології, а й поширеності хромосомних аномалій серед населення, в тому числі через збільшення рівня гомозиготизації алелів і підсилення рекомбінаційних процесів.

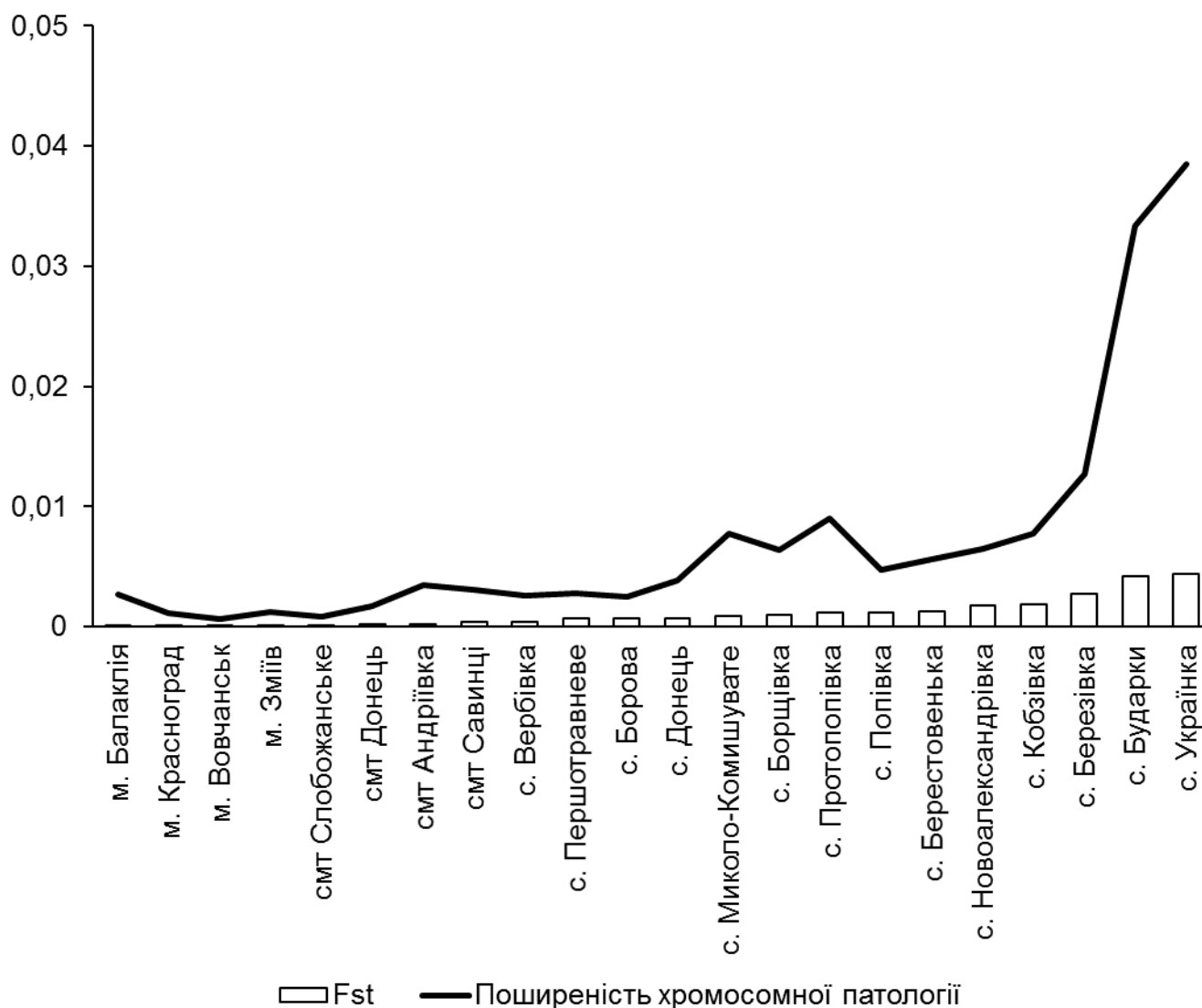


Рис. 7. Аналіз показників випадкового інбридингу та поширеності хромосомної патології у населених пунктах Харківської області: F_{ST} — коефіцієнт випадкового інбридингу

ВИСНОВКИ

У дисертації визначені молекулярно-генетичні особливості та передумови розвитку X-зчепленого іхтіозу і звичайного іхтіозу на Харківщині, структура генетичної патології населення, проаналізовано зв'язок параметрів поширеності досліджених патологій з іншими популяційно-генетичними показниками.

1. Встановлено наявність інтерстиційної делеції гена *STS* *ish del(X)(p22.31p22.31)(STS-)* у хворих на X-зчеплений іхтіоз та їхніх родичів.

2. Досліджено частоти алелів та генотипів за поліморфними варіантами генів одновуглецевого метаболізму в хворих на звичайний іхтіоз. У осіб з іхтіозом, гетерозиготних за мутацією 2282del4 гена *FLG*, вони склали: для rs1801133 — 29% : 71% : 0% CC : CT : TT, для rs1801131 — 53% : 47% : 0% AA : AC : CC, для rs1805087 — 70% : 24% : 6% AA : AG : GG; для rs1801394 — 23% : 53% : 24% AA : AG : GG.

3. Визначено, що серед хворих на іхтіоз, гетерозиготних за мутацією 2282del4 гена *FLG*, частота генотипів 2756AA та 66GG у 1,4–1,6 рази вища, ніж в осіб з іншими генотипами за геном *FLG*, частота генотипу 2756AA — у 1,6 рази вища, а генотипу 66GG — у 1,8 рази нижча, ніж у здорових осіб з генотипом 2282del4/N, частота генотипу 2756AA — у 1,6 рази вища, а генотипу 66GG — у 1,6 рази нижча, ніж в осіб з генотипом N/N.

4. Встановлено, що у гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG* з генотипами *MTHFR* 1298AA/*MTR* 2756AA/*MTRR* 66AG та *MTHFR* 677CT/*MTR* 2756AA/*MTRR* 66AG ризик розвитку звичайного іхтіозу підвищений у понад 5 разів, з генотипом *MTHFR* 677CT/*MTHFR* 1298AA/*MTRR* 66AG — у понад 7 разів, а з генотипом *MTHFR* 677CT/*MTHFR* 1298AA/*MTR* 2756AA/*MTRR* 66AG — у понад 11 разів.

5. Показник поширеності іхтіозу в цілому склав $2,5 \cdot 10^{-4}$, X-зчепленого рецесивного іхтіозу — $1,5 \cdot 10^{-4}$, звичайного іхтіозу — $1,7 \cdot 10^{-4}$ у 2015 р. по Харківській області. Коефіцієнти кореляції між показниками випадкового інбридингу F_{ST} та поширеності X-зчепленого рецесивного іхтіозу ($r = 0,976$) й іхтіозу звичайного ($r = 0,867$) зіставні з даними 2008 р.

6. Встановлено, що показники поширеності моногенної та хромосомної патології серед дітей та підлітків по районах Харківської області у 2015 р. склали 0,36% та 0,08%. У селах поширеність моногенної патології у 4,3 рази більша, ніж у містах — 1,29% та 0,30%. Визначено позитивний зв'язок між показниками випадкового інбридингу F_{ST} та поширеності хромосомної патології ($r = 0,904$).

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Fedota O. M., Roshcheniuk L. V., **Sadovnychenko I. O.**, Gontar J. V., Merenkova I. M., Vorontsov V. M., Ryzhko P. P. Genetic Study of X-Linked Recessive Ichthyosis in Eastern Ukraine. *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55, No. 1. P. 47–52. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010072> (Особистий внесок здобувача: участь у дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
2. Fedota O., **Sadovnychenko I.**, Chorna L., Roshchenyuk L., Vorontsov V., Ryzhko P., Haybonyuk I., Belyaev S., Belozorov I., Makukh H. The effects of polymorphisms in one-carbon metabolism genes on manifestation of ichthyosis vulgaris. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2021. Vol. 9(A). P. 291–297. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6004> (Особистий внесок здобувача: участь у дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
3. Федота О. М., **Садовниченко Ю. О.**, Руденко М.О., Полікова Л.В., Лисак М.П., Зінов'єв Д. І., Білодід Л. М., Дулич Л. А., Федота Н. М. Тягар моногенної і хромосомної патології дитячого населення південного сходу Харківської області. *Український журнал медицини, біології та спорту.* 2019. Т. 4, № 2 (18). С. 284–290. <https://doi.org/10.26693/jmbs04.02.284> (Особистий внесок здобувача: участь у зборі інформації, дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
4. Федота О. М., **Садовниченко Ю. О.**, Грищенко М. І., Тищенко К. В., Грищенко Я. А. Спектр та поширеність генетичної патології серед дітей та

- підлітків північних районів Харківської області. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2019. Вип. 3. С. 20–27. <https://doi.org/10.26565/2617-409X-2019-3-03> (Особистий внесок здобувача: участь у зборі інформації, дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті)
5. Федота О. М., **Садовниченко Ю. О.**, Лисак М. П., Федота Н. М., Роценюк Л. В. Генетико-епідеміологічне дослідження міського та сільського дитячого населення Харківської області на прикладі Зміївського району. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т. 3, № 4 (13). С. 220–225. <https://doi.org/10.26693/jmbs03.04.220> (Особистий внесок здобувача: участь у зборі інформації, дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
 6. Федота О. М., **Садовниченко Ю. О.**, Роценюк Л. В., Воронцов В. М., Рижко П. П. Дослідження поширеності різних форм іхтіозу в Харківській області. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 23. С. 244–248. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1022> (Особистий внесок здобувача: участь у зборі інформації, дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
 7. Федота О. М., **Садовниченко Ю. О.**, Мовчан Н. В., Колодяжний О. В., Долженкова Р. С., Роценюк Л. В., Касьян І. М. Генетико-епідеміологічне дослідження дитячого населення Красноградського району Харківської області. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2018. Т. 16, № 1. С. 52–60. (Особистий внесок здобувача: участь у зборі інформації, дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
 8. Федота А. М., Роценюк Л. В., **Садовниченко Ю. А.**, Меренкова І. Н., Гонтарь Ю. В., Воронцов В. М. Анализ генов одноуглеродного метаболизма и комплекса эпидермальной дифференцировки у больных ихтиозом простым. *Georgian Medical News*. 2017. № 3 (264). С. 90–97. (Особистий внесок здобувача: участь у дослідженні, обговоренні результатів та підготовці статті).
 9. **Садовниченко Ю. О.** Особливості поліморфізму генів одноуглецевого метаболізму серед населення Європи. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVIII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, яка присвячена 25-річчю заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 22–23 квітня 2021 р., м. Харків, Україна*. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2021. С. 141–142.
 10. Федота О. М., Роценюк Л. В., **Садовниченко Ю. О.**, Гонтар Ю. В., Меренкова І. М., Воронцов В. М., Рижко П. П. Репродукційні особливості у родинах з Х-зчепленим іхтіозом. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVIII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, яка присвячена 25-річчю заснування кафедри загальної та клінічної патології медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 22–23 квітня 2021 р., м. Харків, Україна*. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2021. С. 166–167.
 11. **Садовниченко Ю. О.**, Федота О. М. Популяційно-генетичне дослідження населення Харківської області. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та*

- фахівців, яка присвячена 215-річчю заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 26-27 березня 2020 р., м. Харків, Україна. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2020. С. 243–244.
12. **Садовниченко Ю. О.**, Лисак М. П., Колодяжний О. В., Федота Н. М., Мовчан Н. В. Динаміка шлюбно-міграційної структури районів Харківської області. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, яка присвячена 215-річчю заснування медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 26-27 березня 2020 р., м. Харків, Україна.* Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2020. С. 208–209.
 13. **Садовниченко Ю. О.**, Руденко М. О., Зінов'єв Д. І., Федота О. М. Дослідження обтяженості моногенною патологією дитячого населення Балаклійського та Ізюмського районів Харківської області. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XVI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, молодих вчених та фахівців, 28-29 березня 2019 р., м. Харків.* Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2019. С. 227-228.
 14. Fedota O. M., Roshenyuk L. V., Gontar Y. V., Lysenko N. G., Babalian V. O., Tyzhnenko T. V., **Sadovnychenko Y. A.**, Vorontsov V. M., Ryzhko P. P., Gerilovych A. P. Effects of inbreeding on linkage disequilibrium for SNPs of *MTHFR*, *MTR*, *F5*, *LCT* and *VDR3* genes in Ukrainian population. *European Journal of Human Genetics*. 2019. Vol. 27. P18.43C.
 15. **Садовниченко Ю. О.**, Федота Н. М., Мовчан Н. В., Рощенко Л. В., Тижненко Т. В. Обтяженість спадковою патологією дитячого населення районів Харківської області. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців, 25-26 квітня 2018 р., м. Харків.* Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. С. 184.
 16. Мовчан В. С., **Садовниченко Ю. О.**, Мовчан Н. В., Степаненко Б. О. Генетико-епідеміологічне дослідження двосторонньої нейросенсорної втрати слуху у Харківській області. *Медицина третього тисячоліття: збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів, 16-17 січня 2017 р., м. Харків.* Харків, 2017. С. 54–55.
 17. **Садовниченко Ю. О.**, Мовчан Н. В., Рощенко Л. В., Воронцов В. М. Аналіз поширеності моногенних дерматозів на прикладі іхтіозу у Харківській області. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, 30–31 березня 2017 р., м. Харків, у 2-х томах.* Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. Т. 2. С. 78–80.
 18. Федота О. М., Рощенко Л. В., Рижко П. П., Воронцов В. М., Меренкова І. М., **Садовниченко Ю. О.** Біоетичні аспекти при генетичних дослідженнях дерматозів. *Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 105-річчю пам'яті В. К. Висковича, 23–24 травня 2017 р., м. Харків.* Харків, 2017. С. 155-156.

- 19.Рощенюк Л. В., Ришко П. П., Воронцов В. М., Меренкова І. М., Садовниченко Ю. О., Гонтар Ю. В., Федота О. М. Дослідження асоціації мутацій гена *FLG* з розвитком іхтіозу звичайного та гінекологічними захворюваннями. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*: тези III (X) з'їзду Української асоціації лікарів-дерматовенерологів і косметологів, 22–23 листопада 2017 р., м. Львів. 2017. № 4. С. 84–85.
- 20.Федота О. М., Рощенюк Л. В., Ришко П. П., Воронцов В. М., Садовниченко Ю. О. Дослідження поширеності іхтіозу у Харківській області. *Актуальні питання дерматології, венерології, і ВІЛ/СНІД інфекції*: збірник наукових праць. Х.: издательство «Водный спектр», 2016. С. 103–105.
- 21.Рощенюк Л. В., Федота А. М., Гонтарь Ю. В., Ильин И. Е., Воронцов В. М., Садовниченко Ю. А. Молекулярно-цитогенетическое исследование X-сцепленного ихтиоза. *Дерматология та венерология*: труды научно-практической конференции с участием международных специалистов «Инновационные технологии в дерматовенерологии. Междисциплинарные связи», 13–14 ноября 2015 года, г. Харьков. 2015. №3. С. 88–89.

АНОТАЦІЯ

Садовниченко Ю. О. Генетичне дослідження іхтіозу у Харківській області. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика. — Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. — Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

У роботі визначено молекулярно-генетичні/цитогенетичні особливості X-зчепленого рецесивного іхтіозу та звичайного іхтіозу, частоти алелів та генотипів за генами фолатного обміну, параметри нерівноваги за зчепленням, поширеність моногенної та хромосомної патології, коефіцієнт випадкового інбридингу F_{ST} , середній вік укладання шлюбу, дальність та інтенсивність міграції, шлюбну відстань на Харківщині, проаналізовано зв'язок параметрів поширеності досліджених патологій з іншими популяційно-генетичними показниками.

В осіб з X-зчепленим іхтіозом та їхніх родичів виявлено інтерстиційну делецію гена *STS ish del (X)(p22.31p22.31)(STS-)*.

Встановлено географічні особливості розподілу алелів та генотипів за геном *FLG* та поліморфними варіантами генів фолатного метаболізму у країнах Європи.

Серед хворих з генотипом 2282del4/N за геном *FLG* частота генотипу *MTR 2756AA* та *MTRR 66GG* гена у 1,4–1,6 рази вища ($p < 0,01$), ніж у пацієнтів з іншими генотипами за геном *FLG*, частота генотипу 2756AA вища у 1,6 рази, а генотипу 66GG — нижча у 1,8 рази, ніж в осіб з делецією у позиції 2282 без клінічних ознак іхтіозу ($p < 0,001$), частота гомозигот за алелем 2756A гена *MTR* серед них у 1,6 рази вища, а генотипу 66GG — нижча у 1,6 рази, ніж у вибірці осіб з генотипом N/N ($p < 0,001$).

Найвищий ризик розвитку іхтіозу в гетерозигот за мутацією 2282del4 гена *FLG* виявлено в осіб з генотипом *MTHFR* 677CT/*MTHFR* 1298AA/*MTR* 2756AA/*MTRR* 66AG (OR = 11,2; 95% CI 2,512–50,209; $p = 0,002$).

У хворих на іхтіоз та їхніх родичів визначено два блоки зчеплення. Перший включав поліморфні варіанти С677Т та А1298С гена *MTHFR*, які демонстрували сильне зчеплення ($D' = 1,00$; $LOD = 2,32$; $r^2 = 0,195$). Другий утворювали слабо зчеплені мутації гена *FLG* 2282del4 та R501X ($D' = 1,00$; $LOD = 1,53$; $r^2 = 0,109$).

Показники поширеності Х-зчепленого рецесивного іхтіозу та звичайного іхтіозу серед населення Слобожанщини склали $1,5 \cdot 10^{-4}$ та $1,7 \cdot 10^{-4}$. Визначено тягар моногенної та хромосомної патології серед дітей та підлітків по районах — 0,36% та 0,08%.

Встановлено, що серед населення районів Харківщини середній вік вступу до шлюбу склав $27,8 \pm 0,1$ років, показник дальності міграції — $179,03 \pm 14,95$ км, середня шлюбна відстань — $320,40 \pm 28,41$ км. Коефіцієнт випадкового інбридингу F_{ST} становив 0,001292, що майже у 2 рази вище, ніж за сім років до того.

Продемонстровано, що коефіцієнти кореляції між показниками випадкового інбридингу F_{ST} та поширеності Х-зчепленого рецесивного іхтіозу ($r = 0,976$), іхтіозу звичайного ($r = 0,867$) й аутомно-рецесивних захворювань ($r = 0,818$) є зіставними з даними 2008 р.

Виявлено позитивний зв'язок між показниками коефіцієнту випадкового інбридингу F_{ST} та поширеності хромосомної патології ($r = 0,904$).

Ключові слова: звичайний іхтіоз, Х-зчеплений рецесивний іхтіоз, *STS*, *FLG*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, інбридинг, генетична патологія.

SUMMARY

Sadovnychenko I. O. Genetic study of ichthyosis in Kharkiv region. — Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.22 — molecular genetics. — V. N. Karazin Kharkiv National University. — Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis presents molecular genetic/cytogenetic features of X-linked recessive ichthyosis and ichthyosis vulgaris, frequency of alleles and genotypes of folate metabolism-related genes, parameters of linkage disequilibrium, prevalence of single-gene and chromosomal disorders, the fixation index F_{ST} , values of mean age at marriage, mean distance and intensity of migration, marital distance in Kharkiv region, the analysis of correlation between the prevalence of genetic disorders and other population genetic parameters.

In patients with X-linked recessive ichthyosis and their relatives, an interstitial deletion of the *STS* gene ish del (X)(p22.31p22.31)(*STS*–) was detected.

Geographical features of distribution of alleles and genotypes of *FLG* gene and polymorphisms in folate metabolism-related genes in European countries were established.

The frequencies of *MTR* 2756AA genotype and *MTRR* 66GG genotype were 1.4-1.6 times higher in ichthyosis vulgaris individuals heterozygous for 2282del4 than in patients with other *FLG* genotypes ($p < 0.01$). In 2282del4 heterozygotes, the frequency of *MTR* 2756AA genotype in affected individuals was 1.6 times greater than in unaffected ones, but the frequency of *MTRR* 66GG genotype in the first group was 1.8 times lower than in the second one ($p < 0,001$). In affected 2282del4 heterozygotes, the frequency of *MTR* 2756AA genotype was 1.6 times greater, but the frequency of *MTRR* 66GG genotype among them was 1.6 times lower than in individuals with genotypes N/N ($p < 0,01$).

The highest risk of ichthyosis development among heterozygotes for *FLG* 2282del4 mutation was found in individuals with the genotype *MTHFR* 677CT/*MTR* 2798AA/*MTR* 2756AA/*MTRR* 66AG (OR = 11.2; 95% CI 2.512–50.209; $p = 0.002$).

In patients with ichthyosis, two LD blocks were detected. The first one included SNPs of the *MTHFR* gene (C677T and A1298C), that demonstrated strong linkage ($D' = 1.00$; $LOD = 2.32$; $r^2 = 0,195$). The second block consisted of mutations in the *FLG* gene (2282del4 and R501X) with incomplete linkage ($D' = 1.00$; $LOD = 1.53$; $r^2 = 0.109$).

The prevalence of X-linked recessive ichthyosis and ichthyosis vulgaris in Sloboda Ukraine were $1.5 \cdot 10^{-4}$ and $1.7 \cdot 10^{-4}$. The burden of single-gene disorders and chromosome abnormalities in the paediatric population was 0.36% and 0.08%, respectively.

Among the population of districts of Kharkiv region, the mean age at marriage was 27.8 ± 0.1 years, the mean migration distance was 179.03 ± 14.95 km, the marital distance was 320.40 ± 28.41 km. The fixation index F_{ST} was 0.001292, which is almost 2.0 times higher than seven years before.

The correlation values between the rates of fixation index F_{ST} and the prevalence of X-linked recessive ichthyosis ($r = 0,976$), ichthyosis vulgaris ($r = 0,867$), and autosomal recessive diseases ($r = 0.879$) were established to be comparable with 2008 data.

A positive correlation was found between the rates of fixation index F_{ST} and the prevalence of chromosome abnormalities ($r = 0.904$).

Key words: ichthyosis vulgaris, X-linked recessive ichthyosis, *STS*, *FLG*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, inbreeding, genetic disorder.