

УДК [616.716+617.52]-089-003.92

Скрипник В. М.

ГЕН ЕЛАСТИНУ ВИЗНАЧАЄ СХИЛЬНІСТЬ ДО УТВОРЕННЯ ПАТОЛОГІЧНИХ РУБЦІВ

ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія", м. Полтава

Еластин є основним компонентом екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) шкіри. Будь-які структурні, спадкові чи набуті дефекти і / або порушення обміну речовин в ЕЦМ можуть викликати клітинні і тканинні зміни, що призводять до розвитку або прогресування захворювання. З метою визначення участі генетичних чинників в процесі патологічного рубцювання ран вивчали поліморфізм g28197A>G в 20 екзоні гену еластину у групах хворих, які схильні до утворення патологічних рубців, що розташовані у функціонально активних зонах обличчя та шиї, та не схильних до утворення патологічних рубців. Обстежено 38 пацієнтів віком від 18 до 65 років, що знаходилися на стаціонарному і амбулаторному лікуванні після планових хірургічних втручань з приводу різних захворювань, первинної хірургічної обробки ран у різних топографо-анатомічних ділянках голови та шиї. За анамнестичними даними та клінічними спостереженнями за процесом рубцювання ран хворі були розподілені на групи: хворі з наявністю патологічних рубців (основна група (n=18)), що найчастіше розташовані у функціонально активних зонах обличчя та шиї, та хворі, що не мають патологічних рубців (група порівняння (n=20)). Аналіз алельних частот показав, що алель G достовірно частіше зустрічалась в групі хворих, що схильні до утворення патологічних рубців ($\chi^2=5,19$, $p=0,023$). Виявлено достовірну залежність між наявністю поліморфного алеля G та підвищеним ризиком утворення патологічних рубців (ВШ = 3,58, 95% ДІ = 1,3-9,87, $p = 0,023$). Розглядаючи отримані результати можливо припустити, що наявність у хворого мутантної алелі G при місенс мутації g28197A>G в гені ELN є одним із факторів розвитку схильності до утворення патологічних рубців в процесі рубцювання ран.

Ключові слова: поліморфізм, ген еластину, патологічні рубці.

Одним із сучасних підходів до ранньої діагностики патологічних змін шкіри, формування прогнозу, визначення показання для окремих препаратів і вибору правильної лікувальної тактики є пошук генетичних детермінант розвитку структурних змін компонентів екстрацелюлярного матриксу, а саме еластину [1].

Еластин є білок, що відповідає за характерні пружні властивості багатьох тканин. Еластичність шкіри, легенів і великих кровоносних судин залежить від еластичних волокон в позаклітинному матриксі. Вони складаються з аморфних і мікрофібрилярних компонентів, а аморфний компонент, що включає до 90% зрілого еластичного волокна, складається з еластину [2].

На сьогодні багатьма дослідженнями підтверджено, що в результаті порушення [3], внутрішньогенних делецій [4] або точкових мутацій [5] в гені еластину розвиваються такі захворювання як суправальвулярний аортальний стеноз (SVAS), субарахноїдальні аневризми [6], це є одним із факторів розвитку хронічного обструктивного захворювання легень. Показано, що мутації в гені еластину можуть відповідати за порушення пружності в системі еластичних волокон шкіри [7].

Еластин є основним компонентом екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) шкіри. Будь-які структурні, спадкові чи набуті дефекти і / або порушення обміну речовин в ЕЦМ можуть викликати клітинні і тканинні зміни, що призводять до розвитку або прогресування захворювання [8].

Було показано, що ЕЦМ активно бере участь

в клітинних і позаклітинних подіях, які призводять до фіброзу. Фіброз характеризується надмірним накопиченням колагену, еластину та інших компонентів позаклітинного матриксу, і цей процес можна було б порівняти з аберантним загоєнням ран. Націлення вивчення компонентів ЕЦМ на те, як клітини реагують на пошкодження і запальні стимули, є перспективним в якості засобу для запобігання розвитку фіброзу і направлення процесу загоєння ран на відновлення здорової рівноваги [9].

З метою визначення участі генетичних чинників в процесі патологічного рубцювання ран вивчали поліморфізм g28197A>G в 20 екзоні гену еластину у групах хворих, які схильні до утворення патологічних рубців, що розташовані у функціонально активних зонах обличчя та шиї та не схильні до утворення патологічних рубців.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 38 пацієнтів віком від 18 до 65 років, що знаходилися на лікуванні після планових хірургічних втручань з приводу різних захворювань у функціонально активних зонах обличчя та шиї на базі Полтавської обласної клінічної лікарні ім. Скліфосовського у відділенні щелепно-лицевої хірургії та 3-ої міської лікарні м. Полтави з 2008 року по 2012 рік. За анамнестичними даними та клінічними спостереженнями за процесом рубцювання ран хворі були розподілені на групи: хворі з наявністю патологічних рубців (основна група (n=18)), що найчастіше розташовані у функціонально активних ділянках обличчя та шиї, та хворі, що не мають патологічних рубців у відповідних ділянках (група порівняння (n=20)).

Згідно класифікації Резникової А. С., 1999 [10]. до патологічних рубців відносили гіпертрофічні та келоїдні рубці. Дослідження проводили з наданої письмової згоди пацієнтів на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Визначали наявність поліморфізму гену еластину g28197A>G в 20 екзоні (ELN). Проводили дослідження на базі науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Матеріалом для дослідження слугувала периферична кров. Геному ДНК виділяли за допомогою набору «ДНК-експрес» згідно інструкції фірми виробника (ООО НПФ «Литех», Росія).

Мутантні та «дикі» типи алелей гену ELN ампліфікували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміші, що містила: 2,5 мкл 10 x Буф для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів та по 5 пкмоль специфічних проб мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно.

Математична обробка отриманих даних проводилась за допомогою стандартного методу варіаційного аналізу на персональному комп'ютері IBM PC Pentium IV. Аналіз результатів дослідження здійснювався з використанням програм "Microsoft Excel 2003", "Statistica for Windows. Version 5.0". Результати генетичних досліджень оброблені статистично з використанням критерію χ^2 з визначенням вірогідності точним методом Фішера. Відмінності вважали вірогідними при загальноприйнятій у медико-біологічних дослідженнях імовірності помилки $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Наявність «дикого типу» генотипу спостерігали у 33,3% хворих основної групи, частота гетерозиготного генотипу складала 38,9%, а гомозиготний генотип за мутантною алеллю зустрічався у 27,8% хворих даної групи.

Частоти алелей А і G склали 52,8% та 47,2%, а носіями алелей (співвідношення кількості осіб з даною алеллю до загальної кількості осіб в групі) А і G були 72,2% та 61,1% осіб, відповідно.

Внутрішньогруповий розподіл частот генотипів поліморфізму g28197A>G гену еластину в основній групі хворих відповідав теоретично очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (згідно значенням χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтца и G статистики).

Спостерігався нерівномірний розподіл алелей, так як показник адекватного врахування

рідкісних алелей менше двох ($\mu < 2$), на що також вказував показник частки рідкісних алелей ($h > 0$).

Переважає очікуваної гетерозиготності над гетерозиготністю, що спостерігається, а також позитивний коефіцієнт інбридингу свідчили про недостатність гетерозигот при умові випадкового схрещення і про відхилення від панміксії.

Частота гомозиготного генотипу AA гену ELN в групі порівняння складала 65%, гетерозиготний генотип AG зустрічався з частотою 30%, частота мутантного генотипу GG – 5,0%. Аallel G зустрічалась у 80,0%, а аallel A у 20,0% хворих даної групи. Носійство А алелі визначено в 81,5% осіб, а Т алелі – у 65,8%.

Розподіл частот генотипів поліморфізму g28197A>G гену еластину серед хворих групи порівняння відповідав теоретично очікуваному згідно із законом Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 0,0068$, $df = 1$).

При аналізі нормованого відхилення гетерозиготності, що спостерігається (Hobs) від очікуваної (Hex) - коефіцієнт інбридингу популяції (F) - склав менше 0, що відображає наявність незначної недостатності гетерозигот. Адекватність врахування рідкісних алелей в групі порівняння достатня та відповідає нерівномірному розподілу алелей ($\mu < 2$).

При порівнянні частот генотипів AA, AG та GG між хворими основної групи та групи порівняння було виявлено тенденцію до відмінності. Рівень значущості, що отриманий точним тестом Фішера складав $> 0,05$ та $< 0,1$ ($p = 0,062$).

Аналіз алельних частот показав, що аallel G достовірно частіше зустрічалась в групі хворих, що схильні до утворення патологічних рубців ($\chi^2 = 5,19$, $p = 0,023$).

Виявлено достовірну залежність між наявністю поліморфної алелі G та підвищеним ризиком утворення патологічних рубців (ВШ = 3,58, 95% ДІ = 1,3-9,87, $p = 0,023$).

Розглядаючи отримані результати, можливо припустити, що наявність у хворого алелі G поліморфізму g28197A>G в гені ELN є одним із факторів розвитку схильності до утворення патологічних рубців в процесі рубцювання ран.

Як відомо, еластин спочатку синтезується в тропоеластин, розчинний поліпептид з молекулярною масою ~ 72 кДа. Нормальний тропоеластин багатий неполярними амінокислотами, які складають гідрофобні області, що необхідні для створення пружної властивості волокон. Дослідження показали, що в разі місенс мутації в 20 екзоні, яка складається з однієї нуклеотидної заміни g28197A>G, що відповідає S422G заміщенню у білку, неполярні амінокислоти стають незарядженими, що призводить до зміни гідрофобності тропоеластину. Мінливість в амінокислотній послідовності може змінити тропоеластинову конформацію і викликати синтез дефектних еластинових волокон, порушення фібриллогенезу та

спричинити змінену відповідь на ферментативну деградацію [11].

Таким чином, внаслідок накопичення дефектних волокон тропоеластину, при наявності мутантної алелі G в гені ELN, відбувається порушення рівноваги в структурі ЕЦМ, тому визначення даного поліморфізму є актуальним для проведення профілактичних заходів вже на ранніх стадіях загосення післяопераційних ран з метою попередження виникнення патологічних рубців.

Література

1. Indik Z. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA / [Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 5680-5684.
2. Brown-Augsburger P. Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly / P. Brown-Augsburger, T. Broekelmann, J. Rosenbloom., R.P. Mecham // J. Biochem. – 1996. – Vol. 318. – P. 149 – 155.
3. Curran M.E. The elastin gene is disrupted by a translocation causing supravalvular aortic stenosis / M.E. Curran, D.L. Atkinson, A.K. Ewart [et al.] // Cell. – 1993. – Vol. 73. – P. 159-168.
4. Ewart A.K. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene / A.K. Ewart, W. Jin, D. Atkinson [et al.] // J. Clin. Invest. – 1994. – Vol. 93. – P. 1071-1077.
5. Tassabehji M. Elastin genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis / M. Tassabehji, K. Metcalfe, D. Donnai [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 1997. – Vol. 6. – P. 1029-1036.
6. Ruigrok Y.M. Association of polymorphisms and haplotypes in the elastin gene in Dutch patients with sporadic aneurysmal subarachnoid hemorrhage / Y.M. Ruigrok, U. Seitz, S. Wolterink [et al.] // Stroke. – 2004. – Vol. 35. – P. 2064-2068.
7. Cho Michael H. Analysis of Exonic Elastin Variants in Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease / [H. Michael Cho, M. Dawn Ciulla, J. Barbara Klanderma et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 40 (6). – P. 751-755.
8. Graul-Neumann L.M. Highly variable cutis laxa resulting from a dominant splicing mutation of the elastin gene / L.M. Graul-Neumann, I. Hausser, M. Essayie [et al.] // Am J Med Genet A. – 2008. – Vol. 146A (8). – P. 977-983.
9. Järveläinen H. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy / Hannu Järveläinen, Annele Sainio, Markku Koulu [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2009. – Vol. 61, N. 2. – P. 198-223.

Реферат

ГЕН ЭЛАСТИНА ОПРЕДЕЛЯЕТ СКЛОННОСТЬ К ОБРАЗОВАНИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РУБЦОВ

Скрыпник В. М.

Ключевые слова: полиморфизм, гена эластина, патологические рубцы

Эластин является основным компонентом экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) кожи. Любые структурные, наследственные или приобретенные дефекты и / или нарушения обмена веществ в ЭЦМ могут вызвать клеточные и тканевые изменения, приводящие к развитию или прогрессированию заболевания. С целью определения участия генетических факторов в процессе патологического рубцевания ран изучали полиморфизм g28197A> G в 20 экзоне гена эластина в группах больных, склонных к образованию патологических рубцов, расположенных в функционально активных зонах лица и шеи, и не склонных к образованию патологических рубцов. Обследовано 38 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении после плановых хирургических вмешательств по поводу различных заболеваний, первичной хирургической обработки ран в разных топографо-анатомических областях головы и шеи.

По анамнестическим данным и клиническим наблюдениям за процессом рубцевания ран больные были разделены на группы: больные с наличием патологических рубцов (основная группа (n = 18)), что чаще всего расположены в функционально активных зонах лица и шеи, и больные, не имеющие патологических рубцов (группа сравнения (n = 20)). Анализ аллельных частот показал, что аллель G достоверно чаще встречалась в группе больных, склонных к образованию патологических рубцов ($\chi^2 = 5,19$, $p = 0,023$). Выявлено достоверную зависимость между наличием полиморфного аллеля G и повышенным риском образования патологических рубцов (ВШ = 3,58, 95% ДИ = 1,3-9,87, $p = 0,023$). Рассматривая полученные результаты, возможно предположить, что наличие у больного аллели G полиморфизма g28197A> G в гене ELN является одним из факторов развития склонности к образованию патологических рубцов в процессе рубцевания ран.

10. Wight T.N. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? / Thomas N. Wight and Susan Potter-Perigo // AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (Gastrointestinal and Liver Physiology). – 2011. – Vol. 301, N. 6. – P. 950-955.
11. Rodrigues C. J. Elastin (ELN) gene point mutation in patients with inguinal hernia / C. J. Rodrigues, J.H. Yoo, A.J. Rodrigues Jun. // Genetics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 29, N. 1. – P. 45-46.

References

1. Indik Z. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA / [Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 5680-5684.
2. Brown-Augsburger P. Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly / P. Brown-Augsburger, T. Broekelmann, J. Rosenbloom., R.P. Mecham // J. Biochem. – 1996. – Vol. 318. – P. 149 – 155.
3. Curran M.E. The elastin gene is disrupted by a translocation causing supravalvular aortic stenosis / M.E. Curran, D.L. Atkinson, A.K. Ewart [et al.] // Cell. – 1993. – Vol. 73. – P. 159-168.
4. Ewart A.K. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene / A.K. Ewart, W. Jin, D. Atkinson [et al.] // J. Clin. Invest. – 1994. – Vol. 93. – P. 1071-1077.
5. Tassabehji M. Elastin genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis / M. Tassabehji, K. Metcalfe, D. Donnai [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 1997. – Vol. 6. – P. 1029-1036.
6. Ruigrok Y.M. Association of polymorphisms and haplotypes in the elastin gene in Dutch patients with sporadic aneurysmal subarachnoid hemorrhage / Y.M. Ruigrok, U. Seitz, S. Wolterink [et al.] // Stroke. – 2004. – Vol. 35. – P. 2064-2068.
7. Cho Michael H. Analysis of Exonic Elastin Variants in Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease / [H. Michael Cho, M. Dawn Ciulla, J. Barbara Klanderma et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 40 (6). – P. 751-755.
8. Graul-Neumann L.M. Highly variable cutis laxa resulting from a dominant splicing mutation of the elastin gene / L.M. Graul-Neumann, I. Hausser, M. Essayie [et al.] // Am J Med Genet A. – 2008. – Vol. 146A (8). – P. 977-983.
9. Järveläinen H. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy / Hannu Järveläinen, Annele Sainio, Markku Koulu [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2009. – Vol. 61, N. 2. – P. 198-223.
10. Wight T.N. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? / Thomas N. Wight and Susan Potter-Perigo // AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (Gastrointestinal and Liver Physiology). – 2011. – Vol. 301, N. 6. – P. 950-955.
11. Rodrigues C. J. Elastin (ELN) gene point mutation in patients with inguinal hernia / C. J. Rodrigues, J.H. Yoo, A.J. Rodrigues Jun. // Genetics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 29, N. 1. – P. 45-46.

Summary

ELASTIN GENE DETERMINED PREDISPOSITION TO FORMATION OF PATHOLOGICAL SCARS

Skrypnik V.M.

Key words: polymorphism, elastin gene, abnormal scars.

Elastin is the major component of the extracellular matrix (ECM) of the skin. Any structural, inherited or acquired defects and / or metabolic disorders in ECM can cause cellular and tissue changes leading to the development or progression of the disease. To determine the involvement of genetic factors in the process of pathological scarring of wounds we studied polymorphisms g28197A> G in 20 exon of elastin gene in the groups of patients who were prone to the development of pathological scarring, located in functionally active areas of the face and neck, and in those who were not prone to pathological scarring. The study involved 38 patients aged 18 to 65 who were taking the course of in-patient and out-patient treatment following routine surgery for various diseases, primary surgical treatment of wounds in different topographic and anatomic areas of the head and neck. According to their history and clinical observations of wound scarring, the patients were divided into groups: those with the presence of pathological scarring (test group (n = 18)), often located in functionally active areas of the face and neck, and the patients who did not have pathological scarring (comparison group (n = 20)). The analysis of allele frequencies showed that the G allele was significantly more common in the patients, prone to pathological scarring ($\chi^2 = 5,19$, $p = 0.023$). There is significant correlation between the presence of polymorphic G allele and increased risk of pathologic scars (HS = 3.58, 95% CI 1,3-9,87, $p = 0.023$). Considering these results it is possible to suggest that the presence of the G allele polymorphism g28197A> G in ELN gene is one of the factors predisposing to the development of wound scarring.

УДК 616.742-089

Стебловский Д.В.

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЖИ СОСЦЕВИДНОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ОТОПЛАСТИКИ И РИТИДЭКТОМИИ

ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», м. Полтава

На сегодняшний день существует большое количество методик по устранению данных патологий, но ни одна из них не гарантирует оптимального косметического эффекта и не учитывает биомеханические свойства кожно-жировых лоскутов и фиброархитектонику кожи, что в дальнейшем может привести к негативным результатам оперативных вмешательств. Целью исследования было определить оптимальные границы деформации кожно-жировых лоскутов сосцевидной области при проведении косметической отопластики и ритидэктомии. Таким образом, как видно из полученных значений аппроксимации как при ритидэктомии, так и при отопластике, эффективный модуль упругости в обоих случаях практически одинаков, что было ожидаемо в приближении изотропности упругих свойств кожи. Что также говорит об адекватности полученных значений. Так же, следует отметить, что остаточные напряжения в обоих случаях равны соответственно: $\sigma_1^ = 0,94 \cdot 10^4$ Па, $\sigma_2^* = 1,26 \cdot 10^4$ Па. Как видно в случае ритидэктомии значение остаточного напряжения в коже после операции удовлетворяет полностью условию (6), а время T_k меньше двух минут. В случае отопластики остаточное напряжение немного выше σ_{max} , однако его можно привести к оптимальному уменьшив деформацию кожи при натяжении.*

Ключевые слова: отопластика, ритидэктомия, биомеханика, деформация, кожно-жировой лоскут.

С каждым годом растет количество людей, особенно женщин, которые более тщательно относятся к своей внешности [1, 2]. Этот фактор увеличивает количество больных и приводит к бурному развитию реконструктивной и эстетической хирургии лица [3, 4]. Следовательно, становится больше пациентов с лопухостью и птозом кожи нижней трети лица [5]. На сегодняшний день существует большое количество методик по устранению данных патологий, но ни одна из них не гарантирует оптимального косметического эффекта и не учитывает биомеханические свойства кожно-жировых лоскутов и фиброархитектонику кожи, что в дальнейшем может привести к негативным результатам оперативных вмешательств [6, 7].

Целью исследования было определить оптимальные границы деформации кожно-жировых лоскутов сосцевидной области при проведении косметической отопластики и ритидэктомии.

Материалы и методы

Объектом исследования были кожно-жировые лоскуты, взятые у 15 пациентов с инволюционным птозом кожи нижней трети лица, а так же у пациентов с лопухостью. Лоскуты соответствующие каждой из операций подвергались одноосному линейному растяжению [8, 9].

В качестве линейной реологической модели, описывающей механические свойства кожи, выбрана модель Кельвина (Зинера) [9], которая