

УДК: 616.315-007.254:616.315.4-07

Харьков Л.В.^{1,2}, проф., д.мед.н., член-кор., Єгоров Р.І.¹, ас.¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця²Національна академія медичних наук УкраїниKharkov L.V.^{1,2}, Yehorov R.I.¹¹Bogomolets National Medical University²National Academy of Medical Sciences of Ukraine

Експресія мРНК міогеніну та міостатину у м'язах м'якого піднебіння при вроджених його незрощеннях

Mioheninu mRNA in the Muscles and Soft Miostatynu Congenital Cleft Palate at it

Адреса для кореспонденції:
Єгоров Ростислав Ігорович
e-mail: Rostb5@yandex.ru

МЕТА: Оцінити стан м'язів м'якого піднебіння при різних формах його незрощення. **МЕТОДИ:** Дослідження охоплювало 40 дітей із вродженими незрощеннями твердого та м'якого піднебіння, яких розділили на 4 групи. Групу порівняння становили 8 дітей з травмами на межі твердого та м'якого піднебіння, яким під час первинної хірургічної обробки рани забирали біоптати м'язів м'якого піднебіння. **РЕЗУЛЬТАТИ:** За оцінкою експресії міогеніну визначили, що у дітей з ізольованими незрощеннями піднебіння ці показники були вищими у 4 рази, ніж у дітей із наскрізними формами. Рівень експресії міостатину різнився у 1,3 раза. У групі дітей віком від 8-ми місяців до 2-х років, порівняно з групою дітей віком від 2-х до 4-х років, показник експресії мРНК зазначених генів був вищим майже удвічі, що підтверджує зниження міогенного потенціалу з віком. **ВИСНОВКИ:** Отримані результати доводять необхідність проведення ранніх медико-генетичних втручань для покращення функціональних результатів хірургічного лікування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: вроджене незрощення піднебіння, хірургічне лікування, експресія.

PURPOSE: Assess the condition of the muscles of the soft palate in various forms of its nonunion. **Methods:** The study included 40 children with congenital cleft hard and soft palate who were split into 4 groups. For comparative analysis was recruited group of 8 patients, which includes children with injuries on the border of hard and soft palate, which during primary surgical treatment wound biopsies were taken muscles of the soft palate. **RESULTS:** Evaluation of expression miohenina determined that isolated cleft palate when their performance is 4 times higher than the cross forms in the studied groups. The level of expression differs of myostatin 1,3 times. In the age group 8 months 2 years compared with a group of 2-4 years, the value of these gene mRNA expression exceeds almost twice confirming myogenic potential decline with age. **CONCLUSIONS:** The results again point to the need for early surgery with medical genetic basis for higher functional results of surgical treatment.

KEY WORDS: congenital cleft palate surgery, expression.

Вступ

Незрощення верхньої губи та піднебіння є найпоширенішою вродженою вадою розвитку щелепно-лицевої

ділянки [1, 4, 15]. Незрощення верхньої губи та піднебіння у новонародженого призводить до функціональних порушень, пов'язаних зокрема і з життєво важливими функ-

ціями дихання, смоктання і ковтання. Ця вада спричиняє виникнення низки соматичних розладів, що порушують ріст і розвиток дитячого організму [2, 3, 5]. Незважаючи на численні

методики хірургічного лікування незрощень піднебіння у дітей, лікування досі є одним з невіршених завдань щелепно-лицевої хірургії дитячого віку [6]. Однак успішність хірургічного лікування залежить не тільки від виконання оперативного втручання згідно з протоколом, а й від стану м'язів м'якого піднебіння, які й визначають функціональні результати операції. Ймовірно, що результативність залежить від експресії генів, які контролюють процеси міогенезу [7, 9]. Найбільшу увагу вчених привертають міогенін та міостатин [8]. Значення цих білків і рівень експресії їх мРНК не вивчені у дітей із вродженими незрощеннями піднебіння, у яких регенерація м'язової тканини має визначальну роль після оперативного втручання. Мета роботи – оцінити стан м'язів м'якого піднебіння при різних формах його незрощення.

Матеріал і методи

Дослідження охоплювало 40 дітей із вродженими незрощеннями твердого та м'якого піднебіння, яких розділили на 4 групи. До групи порівняння увійшло 8 дітей із травмами на межі твердого та м'якого піднебіння, яким під час первинної хірургічної обробки рани забирали біоптати м'язів м'якого піднебіння. До групи 1 увійшли діти віком від 8-ми місяців до 2-х років з клінічним діагнозом вроджене ізольоване незрощення твердого та м'якого піднебіння (n=10); до групи 2 – діти віком від 8-ми місяців до 2-х років із наскрізним незрощенням верхньої губи, альвеолярного відростка, твердого та м'якого піднебіння (n=10); до групи 3 – діти віком від 2-х до 4-х років із вродженим ізольованим незрощенням твердого та м'якого піднебіння (n=10); групу 4 становили діти віком від 2-х до 4-х років із наскрізним незрощенням верхньої губи, альвеолярного від-

ростка, твердого та м'якого піднебіння (n=10).

Під час велоластики (на етапі освіження країв незрощення) забирали біоптати м'язів м'якого піднебіння розміром 2x2 мм, на підставі яких визначали рівень експресії генів міогеніну та міостатину, що регулюють регенерацію м'язових волокон. мРНК виділяли з використанням набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія). Концентрацію виділеної мРНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 («NanoDrop», США). Зворотню транскрипцію проводили з використанням First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК та гексамерний праймер. Отриману одноланцюгову ДНК піддавали генспецифічній ПЛР-ампліфікації. Для кількісної оцінки експресії гена MYOG використовували набір TaqMan® Gene Expression Assay 7500 Hs00231167_m1, для оцінки експресії гена MSTN – Custom TaqMan® Gene Expression Assay 7500 Hs00103363_m1. Проби для відповідних генів розроблені на основі послідовності мРНК щура («Applied Biosystems», США). Експресію генів MYOG та MSTN нормалізували щодо гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) як ендогенного контролю, використовуючи TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagent (VICMPProbe). ПЛР-ампліфікація складалася з таких 50 циклів: початкова денатурація при 95 °С впродовж 20 с з подальшою обробкою при 95 °С протягом 3 с, гібридизація та елонгація – 60 °С, 30 с. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software.

Результати та їх обговорення

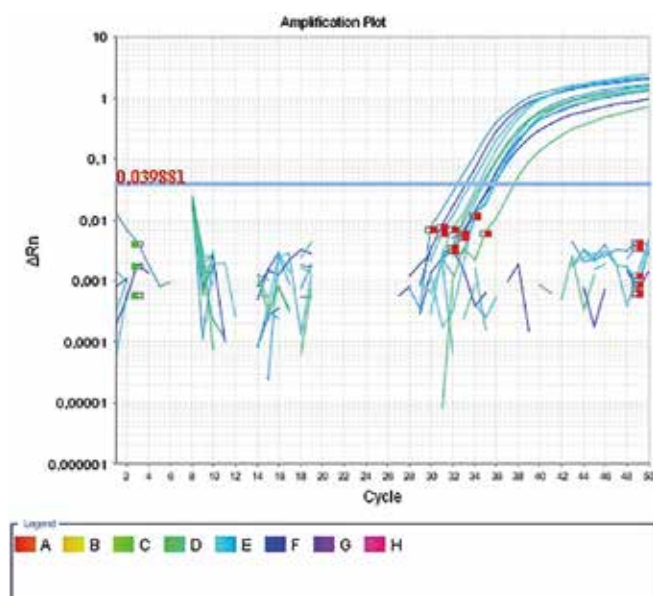
Регенерація скелетних м'язів має важливе значення при м'язових дистрофіях і різних травмах, залежить від камбіального резерву, сформова-

ного клітинами-міосателітами та геннами, які беруть участь у процесі відновлення. Найважливішим з-поміж генів, які відповідають за регенерацію, є міогенін, що належить до сімейства міогенних регулюючих генів, до складу якого входять MyoD, Myf5 і Mrf4 [14]. Ці гени кодуєть сукупність факторів транскрипції, необхідних для розвитку м'язів [12], (мал. 1).

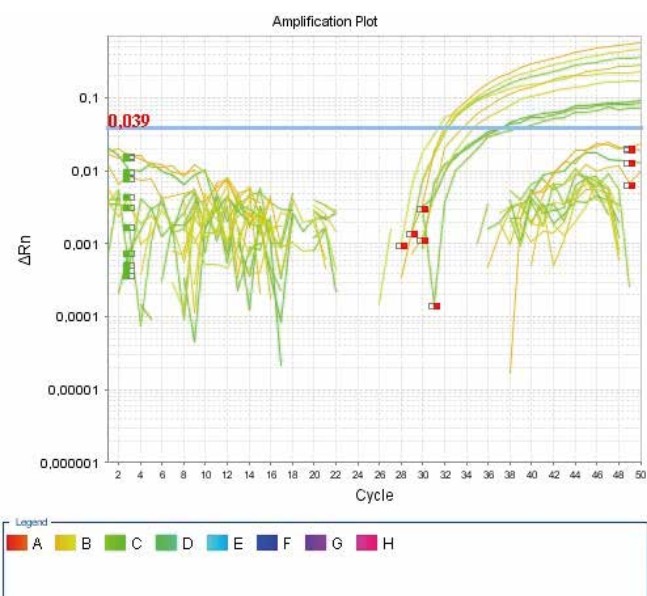
Отримані результати вказують на різний рівень експресії зазначених генів та форми незрощень у вікових групах. На мал. 1 показано рівень експресії мРНК міогеніну щодо мінімального порогового рівня, з огляду на який експресію вважають достатньою та достовірною. Проби, які не перевищили мінімального рівня, показують приблизно однаковий результат, який коливається у межах 0,0001–0,001, та періодично – у межах 0,00001.

Порівнюючи експресію міогеніну у дітей з ізольованими та наскрізними незрощеннями однієї вікової групи, відзначають різке зниження показників, порівняно з групою дітей без патології. Це доводить порушення анатомічної будови та патологічного прикріплення м'язів, розвиток статичних скорочень і високого напруження внаслідок відсутності з'єднання з кістковою основою з одного боку та їх функціонування як антагоністів, а не синергістів. У дітей віком від 8-ми місяців до 2-х років з ізольованими та наскрізними формами, порівняно з групою дітей віком від 2-х до 4-х років, відзначали зниження експресії в 1,3 раза, що підтверджує розвиток дистрофічних змін у м'язах з віком, а саме, вказує на зменшення кількості та проліферативного потенціалу сателітних клітин (R. Bischoff, 1994).

Міостатин (фактор росту і диференціювання 8) – білок, який пригнічує ріст і диференціювання м'язової тканини. Утворюється в м'язах, від-



Мал. 1. Експресія мРНК міогеніну



Мал. 2. Експресії мРНК міостатину

так виділяється у кров, чинить дію на м'язи за допомогою зв'язування з рецепторами ACVR2B (Activin Type II Receptor) [11]. Міостатин людини закодовано у гені MSTN [7] (мал. 2). При аналізі експресії мРНК міостатину спостерігали суттєвіші розбіжності в отриманих результатах. Для міостатину використовували поро-

гову межу 0,039. Рівень експресії, що не перевищив мінімального, коливався у межах від 0,0001 до 0,01, що є досить великою розбіжністю та вказує на відсутність достовірного ряду. Порівнюючи експресію мРНК міостатину у дітей з ізольованими та наскрізними видами незрощень однієї вікової групи, простежували

зниження показників у 1,2 раза. У дітей віком від 8-ми місяців до 2-х років з ізольованими та наскрізними формами, порівняно з дітьми віком від 2-х до 4-х років, відзначали зниження експресії в 1,3 раза. Кількість клітин, пов'язаних із м'язовими волокнами з віком зменшується (H. Degens, 2010), що супроводжується певним збільшенням кількості м'язових резидентних клітин FAP, які зазвичай утворюють жирову і рубцеву тканини, та час міогенезу (A. Uezumi, S. Fukada, N. Yamamoto, S. Takeda, K. Tsuchida, 2010). Отримані результати доводять низьку експресію міогеніну та міостатину у дітей із наскрізними видами незрощень, порівняно з ізольованими формами. У дітей молодшої вікової групи (від 8-ми місяців до 2-х років) рівень експресії вищий, ніж у дітей старшої групи (від 2-х до 4-х років). Низький рівень експресії мРНК міогеніну та міостатину може бути одним з факторів розвитку піднебінно-глоткової недостатності після оперативного втручання [14].

Аналізуючи дані дітей без незрощення, ми отримали результати які підтверджують вищий міогенний потенціал у дітей молодшої групи (від 8-ми місяців до 2-х років), порівняно з ді-

Таблиця 1. Рівень експресії міогеніну залежно від віку та виду незрощення

Групи пацієнтів	Вік дітей	
	8 місяців-2 роки	2-4 роки
Пацієнти без патології (контрольна група), n=8	9,21-10,3	7,1-8,3
Пацієнти з ізольованим незрощенням піднебіння, n=10	0,75-0,9	0,14-0,37
Пацієнти з наскрізним незрощенням піднебіння, n=10	0,03-0,05	0,01-0,02

Таблиця 2. Рівень експресії міостатину залежно від віку дитини та виду незрощення

Вид незрощення	Вік дітей	
	8 місяців-2 роки	2-4 роки
Без патології (контрольна група), n=8	15,16-16,82	10,32-11,93
Ізольоване незрощення піднебіння, n=10	0,98-1,43	0,56-0,63
Наскрізне незрощення піднебіння, n=10	0,13-0,23	0,06-0,09

Таблиця 3. Співвідношення експресії мРНК міостатину та міогеніну

Вид незрощення	Вік дітей	
	8 місяців-2 роки	2-4 роки
Ізольоване	1,2(N):0,8*(n)=3/2 (в 1,5 раза)	0,58:0,33*(=1,7)
Наскрізне	0,17:0,04*(4,25)	0,07:0,02*(3,5)
Без патології (контрольна група)	15,9:10,1*(1,6)	11,2:7,5*(1,5)

Примітки: N – рівень експресії міогеніну; n – рівень експресії міостатину

тьми віком 2–4 роки, що вказує на його зниження з віком.

Порівнювали співвідношення експресії мРНК міостатину та міогеніну у групі дітей з ізольованими формами незрощень, яке майже збіглося з рівнем експресії цих генів у контрольній групі. Співвідношення експресії у цих групах становило від 1,5 до 1,7 залежно від віку, що вказує на вищий потенціал м'язів м'якого піднебіння для подальшої регенерації та самовідновлення у післяопераційному періоді. У дітей із наскрізними формами незрощень спостерігали

співвідношення від 3,5 до 4,25, тобто рівень мРНК міостатину значно перевищував рівень мРНК міогеніну. Отож, можна припустити, що окрім більш вираженої патологічної анатомії у цих пацієнтів, міостатин пригнічує функцію міогеніну, що перешкоджає м'язам самовідновлюватися та повноцінно функціонувати.

Висновки

Завдяки оцінці експресії міогеніну визначили, що у дітей з ізольованими незрощеннями піднебіння показни-

ки експресії були вищими у 4 рази ніж у дітей із наскрізними формами. Рівень експресії міостатину різнився в 1,3 раза. У групі дітей віком від 8-ми місяців до 2-х років, порівняно з групою дітей віком від 2-х до 4-х років, показник експресії мРНК цих генів був більшим майже вдвічі, що доводить зниження міогенного потенціалу з віком. Отже, отримані показники ще раз вказують на необхідність проведення ранніх медико-генетичних втручань для отримання кращих функціональних результатів хірургічного лікування.

Список використаної літератури

- Mossey P., Little J., Munger R.G., Dixon M.J., Shaw W.C. Cleft lip and palate. *Lancet*. – 2009;374:1773–1785.
- Kharkov L. Evolution of methods of uranostaphyloplasty exemplified by the analysis of the 1118 primary operations for congenital palatal defects // *British J. of Oral and Maxilla-facial Surgery*. – 1999,3,15–20.
- Bessell A., Hooper L., Shaw W.C., Reilly S., Reid J., Glennly A.M. Feeding interventions for growth and development in infants with cleft lip, cleft palate or cleft lip and palate. *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2011;(4).
- Gundlach K.K.H., Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and worldwide // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. – 2006;34 (Supplement 2):1–2.
- Le T.M. Aesthetic rehabilitation involving a cleft lip and palate / T.M. Le // *Dent. Today*. – 2008. – Vol. 27, No 10. – P. 124, 126, 128.
- Jones J.E., Sadove A.M., Dean J.A., Huebener D.V. Multidisciplinary team approach to cleft lip and palate management / Dean J.A., Avery D.R., McDonald R.E., editors. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 9 th ed. – New Delhi: Elsevier; 2012. – P. 614–37.
- Dixon M.J., Marazita M.L., Beaty T.H., Murray J.C. (2011) Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences // *Nat. Rev. Genet.* 12: 167–178.
- de Pontual L., Yao E., Callier P., Faivre L., Drouin V., et al. (2011). Germline deletion of the miR-17- 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. – *Nat. Genet.* 43: 1026–1030.
- Alway S.E., Degens H., Lowe D.A., Krishnamurthy G. (2002). Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 282. – P. 411–422.
- Galmozzi A., et al. (2013). Inhibition of class I histone deacetylases unveils mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue // *Diabetes* 62, 732–742.
- Lee, S.H., Joo, S.T., Ryu, Y.C., 2010. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality // *Meat Sci.* 86, 166–170.
- Mozdziak P.E., Greaser M.L., Schultz E. (1998). Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy // *J. Appl. Physiol.* – 84,1359–1364.
- Siu P.M., Donley D.A., Bryner R.W., Alway S.E. (2004). Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training // *J. Appl. Physiol.* – 97,277–285.
- Meligy F.Y., Shigemura K., Behnsawy H.M., Fujisawa M., Kawabata M., Shirakawa T. The efficiency of in vitro isolation and myogenic differentiation of MSCs derived from adipose connective tissue, bone marrow, and skeletal muscle tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2012;48:203–15.
- Харьков Л.В., Шоу В., Семб Г. Обзор состояния помощи детям с несращением верхней губы и неба в Европейских странах // *Вісник стоматології*. – 2001. – №3. – С. 55–59.

REFERENCES

- Mossey, P., Little, J., Munger, R.G., Dixon (2009). *Lancet*, 374:1773–1785 (in English).
- Kharkov, L. (1999). *British J. of Oral and Maxilla-facial Surgery*, 3, 15–20 (in English).
- Bessell, A., Hooper, L., Shaw, W.C., Reilly, S., Reid, J., Glennly, A.M. (2011). *Cochrane Database Syst. Rev.*, (4) (in English).
- Gundlach, K.K.H., Maus, C. (2006). *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 34 (Supplement 2):1–2 (in English).
- Le, T.M. (2008). *Dent. Today*, Vol. 27, No 10, P. 124, 126, 128 (in English).
- Jones, J.E., Sadove, A.M., Dean, J.A., Huebener, D.V. (2012). Multidisciplinary team approach to cleft lip and palate management / Dean J.A., Avery D.R., McDonald R.E., editors. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 9 th ed. – New Delhi: Elsevier, P. 614–37 (in English).
- Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H., Murray, J.C. (2011). *Nat. Rev. Genet.*, 12: 167–178 (in English).
- de Pontual, L., Yao, E., Callier, P., Faivre, L., Drouin, V., et al. (2011). *Nat. Genet.*, 43: 1026–1030 (in English).
- Alway, S.E., Degens, H., Lowe, D.A., Krishnamurthy, G. (2002). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282, P. 411–422 (in English).
- Galmozzi, A. et al. (2013). *Diabetes*, 62, P. 732–742 (in English).
- Lee, S.H., Joo, S.T., Ryu, Y.C. (2010). *Meat Sci.* 86, P. 166–170 (in English).
- Mozdziak, P.E., Greaser, M.L., Schultz, E. (1998). *J. Appl. Physiol.*, 84, P. 1359–1364 (in English).
- Siu, P.M., Donley, D.A., Bryner, R.W., Alway, S.E. (2004). *J. Appl. Physiol.*, 97, P. 277–285 (in English).
- Meligy, F.Y., Shigemura, K., Behnsawy, H.M., Fujisawa, M., Kawabata, M., Shirakawa, T. (2012). *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. J.*, 48:203–15 (in English).
- Har'kov, L.V., Shou, V., Semb, G. (2001). *Visnik stomatologii*, 3, P. 55–59 (in Russian).