

© Скрипник В. М., Аветіков Д. С., Шликова О.А., Кайдашев І. П.
УДК 575.191+616-003.92

g28197A>G

Скрипник В. М., Аветіков Д. С., Шликова О.А., Кайдашев І. П.

ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія", м. Полтава

Еластин являється основним компонентом екстрацелюлярного матрикса (ЕЦМ) 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 клиническими наблюдениями 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 мутантной аллели G при миссенс мутации g28197A G в гене ELN является одним из факторов развития склонности к образованию патологических рубцов в процессе рубцевания ран.

Ключевые слова: полиморфизм, гена эластина, патологические рубцы

В теперішній час значні успіхи генетики, розшифровка структури геному людини, дозволили досягти більшого прогресу у розумінні природи і механізму виникнення ряду патологічних процесів. 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, 2].

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. Людський ген еластину (ELN) розміром 45 кб знаходиться на 7q11.2 хромосомі і складається з 34 екзонів [3, 4].

На сьогодні багатьма дослідженнями підтверджено, що в результаті порушення [5], внутрішньогенних делецій [6] або точкових мутацій [7] в гені еластину, розвиваються такі захворювання як суправальвулярний аортальний стеноз (SVAS), субарахноїдальні аневризми [8], це є одним із факторів розвитку хронічного обструктивного захворювання легень [9]. Показано, що мутації в гені еластину можуть відповідати за порушення пружності в системі еластичних волокон шкіри [10].

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 [11].

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 абераційним 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 [12].

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

Матеріали та методи дослідження

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 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 зонах обличчя та шиї, та хворі, що не мають патологі-

чних рубців (група порівняння (n=20)). Згідно класифікації Резникової А. Є., 1999 [12], 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 Таг з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів та по 5 пкмоль специфічних проб мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'-кінця і ВНQ-1, ВНQ-2 з 3'-кінця, відповідно (табл.1).

Таблиця 1
Послідовність специфічних праймерів та специфічних проб

Ген		Послідовність
ELN	Праймери	5'-GGA GTC GGA GGT ATC CCT GG -3' 5'-TGA CTA AGG CTC ACG GGA AAT G-3'
	Проби	(FAM) TG TCC CTG GTG TCG GAG -(ВНQ1) (R6G) TG TCC CTA GTG TCG GAG -(ВНQ2)

До суміші додавали 20-50 нг геномної ДНК обстежуваних. Ампліфікацію гену *ELN* проводили на детектуючому ампліфікаторі ДТ-322 (ООО «НПО ДНК-Технологія», Росія) в режимі реального часу, наступним чином: перший цикл - 95°C/2 хвилини; 40 циклів - 95°C/20 секунд; 63°C/40 секунд.

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

Розподіл частот генотипів та алелей поліморфізму g28197A>G гену еластину (ELN) в основній групі хворих наведено в таблиці 2.

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.

Таблиця 2
Розподіл частот генотипів і алелей поліморфізму g28197A>G гену *ELN* серед хворих основної групи та групи порівняння, % (n).

Генотип, алель	Основна група (n=18)	Група порівняння (n=20)
1	2	3
AA	33,3 (6)	65,0 (13)
AG	38,9 (7)	30,0 (30)
GG	27,8 (5)	5,0 (1)
A	52,8 (19/36)	80,0 (32/40)
G	47,2 (17/36)	20,0 (8/40)

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 і G статистики) (табл. 3.).

Таблиця 3
Внутрішньогруповий аналіз розподілу частот генотипів і алелей поліморфізму g28197A>G гену *ELN*

Показник	Основна група (n=18)	Група порівняння (n=20)
1	2	3
χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтца, df=1	0,5736	0,0068
Значення G статистики (G)	1,10426	0,004
Число ступенів свободи для G (V)	1,92	0,59
Критичний рівень значення G для $p=0,05$ ($\chi_a^2(v)$)	5,87	2,55
Частота алелю (p)	0,528	0,8
Частота алелю (q)	0,472	0,2
Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs)	0,3889	0,3
Очікувана гетерозиготність (Hex)	0,4985	0,32
Нормоване відхилення Hobs від Hex (коефіцієнт інбридингу популяції) (F)	0,2198	2
Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ)	1,998	0,0625
Частка рідкісних алелей (h)	0,001	1,8
χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтца, df=1	0,5736	0,1
Значення G статистики (G)	1,10426	0,0068
Число ступенів свободи для G (V)	1,92	0,004

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 % (табл. 2.). Алель А зустрічалась у

80,0%, а алель G 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 ($\chi^2=0,0068$, $df=1$) (табл.3.).

При аналізі нормованого відхилення гетерозиготності, що спостерігається (Hobs) від очікуваної (Hex) - коефіцієнт інбридінгу 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 $<0,1$ ($p=0,062$) (табл. 2).

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

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.

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 [14].

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

Література

1. Кайдашев И. П. Эволюционирование и современное состояние фармакогенетических исследований (часть1) / И. П. Кайдашев, О. А. Шлыкова, О. В. Измайлова // Проблемы экологии та медицины. - 2010. - № 5-6. - С. 3-12.
2. Куценко Н. Л. Связь полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов 2 и 4 с аллергическими заболеваниями с повышенными уровнями специфических иммуноглобулинов E / Н. Л. Куценко, О. В. Измайлова, Л.Э. Веснина, И. П. Кайдашев // Цитология и генетика. – 2012. - № 6. – С. 59-66.
3. Indik Z. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA / [Z. Indik, H. Yeh, Ornstein-Goldstein N., et all.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1987. – Vol. 84. – P. 5680-5684.;
4. P. Brown-Augsburger Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly / P. BROWN-AUGSBURGER, T. BROEKELMANN, J. ROSENBLUM., R. P. MECHAM // Biochem. J. - 1996. – Vol. 318. – P. 149 – 155.
5. Curran M.E. The elastin gene is disrupted by a translocation causing supravalvular aortic stenosis / Curran M.E., Atkinson D.L., Ewart A.K., Morris C.A., Leppert M.F., Keating .T. // Cell. – 1993. – Vol. 73. P. 159-168]
6. Ewart A.K., Jin W., Atkinson D., Morris C.A., Keating M.T. Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. J. Clin. Invest. 1994;93:1071-1077
7. Tassabehji M., Metcalfe K., Donnai D., Hurst J., Reardon W., Burch M., Read .P. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. Hum. Mol. Genet. 1997;6:1029-1036
8. Ruigrok Y.M. Association of polymorphisms and haplotypes in the elastin gene in Dutch patients with sporadic aneurysmal subarachnoid hemorrhage / Ruigrok YM, Seitz U, Wolterink S, Rinkel GJ, Wijmenga C, Urban Z // Stroke. – 2004. – Vol. 35. – P. 2064 –2068
9. Cho Michael H. Analysis of Exonic Elastin Variants in Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease / [Michael H. Cho, Dawn M. Ciulla, Barbara J. Klanderman, Craig P. et all.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 40(6). – P. 751–755.
10. 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 , A. Rauch , C. Kraus // Am J Med Genet A. - 2008.- Vol/146A(8). - P. 977-983
11. Järveläinen H. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy / Hannu Järveläinen, Anneli Sainio, Markku Koulu, Thomas N. Wight , Risto Penttinen // Pharmacological Reviews. – 2009. - Vol. 61, N. 2. – P. 198-223
12. 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
13. Резникова А. Е. Клинико-морфологические особенности, лечение и профилактика рубцов лица и шеи у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1999.
14. Elastin (ELN) gene point mutation in patients with inguinal hernia / Consuelo Junqueira Rodrigues, Jin Hwan Yoo and Aldo Junqueira Rodrigues Junior // Genetics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 29, N.1. – P. 45-46.

Summary

POLYMORPHISM g28197A>G GENE DEFINES ELASTIN TENDENCY TO FORM SCAR PATHOLOGICAL

Skrypnyk V. M., Avetikov D. S., Shlykova O. A., Kaidashev I. P.

Key words: polymorphism, gene elastin, abnormal scars

Elastin is a major component of the extracellular matrix (ECM) of the skin. Any structural, hereditary or acquired defects and / or metabolism in ECM can cause cell and tissue changes that lead to the development or progression of the disease. To determine the role of genetic factors in the process of pathological scarring wounds studied polymorphism g28197A>G in exon 20 of the gene elastin in groups of patients who are prone to the formation of

pathological scars that are functionally active in the areas of the face and neck, and not prone to the formation of pathological scars. The study involved 38 patients aged 18 to 65 who were in inpatient and outpatient treatment after elective surgical interventions for various diseases, primary surgical treatment of wounds in different topographic and anatomic sites of the head and neck. According to the anamnesis and clinical observations of the process of scarring wounds patients were divided into groups: patients with the presence of pathological scars (study group (n = 18)), which are often situated in functionally active areas of face and neck, and patients with no pathological scarring (comparison group (n = 20)). Analysis of allele frequencies showed that the G allele was significantly more common in patients who are prone to the formation of pathological scars ($\chi^2 = 5,19$, $p = 0,023$). A reliable correlation between the presence of polymorphic allele G and increased risk of formation of pathological scars (HS = 3.58, 95% CI = 1,3-9,87, $p = 0.023$). Considering these results may suggest that the presence of the patient's mutant allele G at misens mutations g28197A>G in the gene ELN is a factor of susceptibility to the formation of pathological scars in the process of scarring wounds.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

Матеріал надійшов до редакції 21.11.2012 р.