

УСТАНОВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ДЕРМАТОЗАМИ

Руденкова Т. В., Костюк С. А., Шиманская И. Г.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Взаимосвязь между структурными изменениями кожи и уровнем активности генов, контролирующих синтез коллагена и эластина, у пациентов с хроническими дерматозами не изучена. В результате проведения исследований установлено, что наличие морфологических изменений в коже пациентов с хроническими дерматозами ассоциировано с уровнями нормализованной экспрессии гена COL1A1 менее 100 % и/или гена COL1A2 менее 200 % и/или гена LOX менее 50 %. Метод ПЦР в режиме реального времени (РВ) можно использовать для объективной оценки степени изменений в коже у пациентов с хроническими дерматозами.

Ключевые слова: хронический дерматоз, морфотип кожи, морфологическая характеристика, гены.

Введение. Увеличение в последние годы числа пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи, а также наличие нерешенных вопросов, связанных с этиологией, патогенезом и методами лечения, делает данную патологию значимой проблемой современного здравоохранения [1, 2].

Одной из актуальных задач является определение перечня молекулярно-генетических маркеров для стандартизированной и объективной оценки изменений в глубоких слоях кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией. Изучение и комплексный анализ клинических данных, морфологических характеристик и уровней нормализованной экспрессии генов, контролирующих синтез и созревание коллагена и эластина в коже пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией, позволят установить наличие возможной ассоциации между данными маркерами и выделить молекулярно-генетические критерии для оценки состояния кожи пациентов.

Цель работы — на основании комплексного анализа установить ассоциации между клинико-морфологическими и молекулярно-генетическими маркерами в биоптатах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией.

Материалы и методы. Группу исследования составили пациенты (n = 224) со следующими нозологическими формами заболеваний: L90 (атрофические поражения кожи), L93 (красная волчанка), L94 (другие локализованные изменения соединительной ткани), L43 (лишай красный плоский), L57.4 (возрастная атрофия кожи).

В ходе исследования пациенты были разделены на группы с учетом нозологических форм заболевания следующим образом: группа 1 — пациенты с ограниченными формами склеродермии (n = 101); группа 2 — пациенты с дискоидной красной волчанкой (n = 32); группа 3 — пациенты с возрастной атрофией кожи (n = 91).

В ходе клинико-морфологических исследований оценивали характер атрофических изменений кожи, а также изучали морфологические маркеры патологических процессов, сопровождающихся атрофией кожи.

Во время исследования для визуальной оценки степени атрофии кожи применялась разработанная ранее оценочная шкала [3], в которой учитывались следующие показатели: морфотип кожи, толщина подкожно-жировой клетчатки, степень проявлений птоза.

С целью оценки морфологических характеристик атрофических изменений кожи проводилось гистологическое исследование. Объектом исследования послужил биопсийный материал кожи, полученный при выполнении панч-биопсий диаметром от 1 до 4 мм. Оценка морфологических параметров проводилась с использованием светового оптического микроскопа «Leica DC 200» при увеличениях $\times 50, 100, 200, 400$.

Полученный биопсийный материал фиксировали и заключали в парафин. Из парафиновых блоков выполняли ступенчатые гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые депарафинировали в ксилоле, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Помимо рутинной окраски гематоксилином и эозином выполняли дополнительные гистохимические методики: окраска по Харт–Вейгерту (для оценки изменений эластических волокон), по Массону (для выявления изменений коллагеновых волокон) [4].

При микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, и дополнительными методиками оценивали характер выявленных изменений в эпидермисе, а также в дерме (состояние коллагеновых и эластических волокон, наличие эластоза).

При проведении молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала использовали панч-биоптаты кожи, которые хранили с использованием реагента RNA later (Sigma). Выделение РНК проводили с применением набора реагентов PureLink RNA Micro Kit (Invitrogen). Далее РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), dNTP (Invitrogen) и Ribonuclease inhibitor (Invitrogen). Полученную кДНК использовали для постановки TaqMan ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

ПЦР-РВ проводили с применением Quick-Load Taq 2X Master Mix (Праймтех, РБ) специально подобранных пар праймеров и зондов для каждого гена, включая house-keeping ген (*HGUS*), на термоциклере «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). В каждой пробирке проводили амплификацию одного из исследуемых генов, контролирующего синтез и созревание коллагена и эластина (*COL1A1, COL1A2, LOX, P3H1, ELN*), и house-keeping гена *HGUS*, относительного которого проводилась нормализация, по значениям пороговых циклов (Ct) исследуемых генов для сравнения уровней экспрессии [5].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы «Statistica 10». В ходе анализа использовали непараметрические методы статистического анализа, однофакторный и многофакторный анализ.

Результаты и их обсуждение. В группе 1 ($n = 101$) у большинства пациенток (86,14 %, $n = 87$) наблюдался смешанный морфотип изменений кожи; у 10,89 % ($n = 11$) — мелкоморщинистый и у 2,97 % ($n = 3$) — гравитационный морфотип. В группе 2 ($n = 32$) смешанный морфотип был выявлен у 81,25 % пациенток ($n = 26$); мелкоморщинистый — у 12,5 % ($n = 4$) и гравитационный — у 6,25 % ($n = 2$). В группе 3 ($n = 91$) смешанный морфотип был установлен у 69,23 % пациенток ($n = 63$); мелкоморщинистый — у 20,88 % ($n = 19$) и гравитационный — у 9,89 % ($n = 9$) (таблица 1).

Таблица 1. — Частота выявления различных морфотипов кожи у обследованных групп пациентов

Морфотип кожи	Частота выявления признака (% , n)		
	группа 1 (n = 101)	группа 2 (n = 32)	группа 3 (n = 91)
Смешанный	86,14 (87)	81,25 (26)	69,23 (63)
Мелкоморщинистый	10,89 (11)	12,5 (4)	20,88 (19)
Гравитационный	2,97 (3)	6,25 (2)	9,89 (9)

В ходе дальнейшего анализа оценивали степень выраженности изменений морфотипа кожи, изменение толщины подкожно-жировой клетчатки, степень проявлений птоза. Все показатели оценивали по шкале от 0 до 3 баллов.

У всех пациенток группы 1 ($n = 101$) степень выраженности изменений морфотипа кожи была оценена в 2 балла. Степень выраженности изменений подкожно-жировой клетчатки в данной группе была оценена в 2 балла у 4,95 % пациенток ($n = 5$); у остальных 95,05 % ($n = 96$) степень выраженности подкожно-жировой клетчатки составляла от 0,5 до 1,5 см и была в среднем оценена в 1 балл. Степень птоза у 4,95 % пациенток ($n = 5$) была оценена в 0 баллов; у 95,05 % ($n = 96$) — в 1 балл.

В группе 2 ($n = 32$) степень выраженности изменений морфотипа кожи была оценена в 2 балла у 90,63 % пациенток ($n = 29$); у 9,38 % ($n = 3$) — в 3 балла. Степень выраженности изменений подкожно-

жировой клетчатки у всех пациенток (n = 32) была оценена в 1 балл. Степень птоза у 18,75 % женщин (n = 6) была оценена в 1 балл; у 81,25 % (n = 26) — в 2 балла.

Степень выраженности изменений морфотипа кожи в группе 3 (n = 91) была оценена в 2 балла у 89,01 % пациенток (n = 81); в 3 балла — у 10,99 % (n = 10). Степень выраженности изменений подкожно-жировой клетчатки у 14,29 % пациенток данной группы (n = 13) была оценена в 1 балл; у 82,42 % (n = 75) — в 2 балла и у 3,29 % (n = 3) — в 3 балла. Степень птоза у 95,61 % пациенток (n = 87) была оценена в 2 балла; у 4,39 % (n = 4) — в 3 балла.

В ходе оценки морфологических характеристик кожи проводилось изучение явлений атрофии кожи в виде истончения эпидермиса и сглаженности дермальных сосочков. Результаты, полученные в ходе проведения данного этапа, представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Наличие признаков атрофии эпидермиса у обследованных (n = 224)

Морфологическая характеристика	Частота выявления	
	n	%
Наличие признаков атрофии эпидермиса	27	12,05
Отсутствие признаков атрофии эпидермиса	197	87,95

Признаки атрофии эпидермиса были выявлены у 12,05 % (n = 27) среди всех обследованных, из них: 9 пациенток — в группе 1; 4 — в группе 2; 14 — в группе 3.

Для характеристики состояния коллагеновых волокон оценивали их утолщение и гомогенизацию с учетом локализации в определенных отделах дермы (на всем протяжении, очагово) при окраске гематоксилином и эозином, а также при дополнительной окраске по Массону.

В ходе исследований было установлено, что у пациенток группы 1 в 80,19 % случаев (n = 81) наблюдалось очаговое утолщение коллагеновых волокон; утолщение коллагеновых волокон на всем протяжении дермы было отмечено у 9,91 % (n = 10). В группе 2 в 84,38 % случаев (n = 27) было отмечено очаговое утолщение коллагеновых волокон в дерме и в 15,62 % (n = 5) — утолщение коллагеновых волокон на всем протяжении дермы. В группе 3 у 61,54 % пациенток (n = 56) было отмечено очаговое утолщение коллагеновых волокон в дерме и у 38,46 % (n = 35) — утолщение коллагеновых волокон на всем протяжении (таблица 3).

Таблица 3. — Частота выявления изменений коллагеновых волокон в дерме у обследованных

Вид поражения	Группа 1 (n = 101)		Группа 2 (n = 32)		Группа 3 (n = 91)	
	n	%	n	%	n	%
Очаговое утолщение	81	80,19	27	84,38	56	61,54
На всем протяжении	10	9,91	5	15,62	35	38,46

В ходе оценки солярного эластоза в дерме в группе 1 отсутствие явлений солярного эластоза было отмечено в 21,78 % случаев (n = 22); минимальные явления солярного эластоза — в 67,39 % случаев (n = 61); явления солярного эластоза умеренной степени — в 17,82 % случаев (n = 18). В группе 2 явления солярного эластоза в той или иной степени отмечались во всех случаях: минимальные явления солярного эластоза были отмечены в 25,0 % случаев (n = 8); явления солярного эластоза умеренной степени — в 46,88 % (n = 15); выраженные явления солярного эластоза — в 28,13 % случаев (n = 9). В группе 3 явления солярного эластоза также были отмечены в 100 % случаев: в 7,69 % (n = 7) — минимальные явления солярного эластоза; в 92,31 % (n = 84) — явления солярного эластоза умеренной степени.

При использовании дополнительной гистохимической окраски по Харт–Вейгерту для объективной оценки состояния эластических волокон установлено, что в группе 1 встречались: фрагментация и уменьшение эластических волокон — в 76,24 % случаев (n = 77); уменьшение количества эластических волокон вплоть до исчезновения — в 10,89 % (n = 11); уплотнение эластических волокон в верхней трети дермы — в 12,87 % (n = 13). У пациентов группы 2 были отмечены: фрагментация эластических волокон — 50,0 % случаев (n = 16); фрагментация и уменьшение эластических волокон — в 28,13 % случаев (n = 9); уменьшение эластических волокон вплоть до исчезновения — в 21,88 % случаев (n = 7). В группе 3 фрагментация эластических волокон была выявлена в 86,81 % случаев (n = 79); фрагментация и уменьшение эластических волокон — в 5,49 % (n = 5); уплотнение эластических волокон в верхней трети дермы — в 7,69 % (n = 7) (таблица 4).

Таблица 4. — Частота выявления изменений эластических волокон дермы у обследованных

Характер изменений	Частота выявления изменений (n (%))		
	группа 1 (n = 101)	группа 2 (n = 32)	группа 3 (n = 91)
Фрагментация эластических волокон	–	50,0 (16)	86,81 (79)
Фрагментация и уменьшение количества эластических волокон	76,24 (77)	28,13 (9)	5,49 (5)
Уменьшение количества эластических волокон вплоть до исчезновения	10,89 (11)	21,88 (7)	–
Уплотнение эластических волокон в верхней трети дермы	12,87 (13)	–	7,69 (7)

При проведении оценки уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) генов, контролирующих синтез и созревание коллагена и эластина с использованием разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ, были определены значения для гена *COL1A1* — Me 102,2 (16,4/575,3) %; для гена *COL1A2* — Me 278,2 (81,9/924,6) %; для гена *LOX* — Me 77,4 (10,5/228,2) %; для гена *P3H1* — Me 15,2 (8,9/64,6) %; для гена *ELN* — Me 32,7 (8,2/67,8) %. Значения уровней нормализованной экспрессии генов, контролирующих синтез и созревание коллагена и эластина, в обследованных группах пациентов представлены в таблице 5.

Таблица 5. — Значения уровней нормализованной экспрессии генов, контролирующих синтез и созревание коллагена и эластина, у обследованных

Ген	% УНЭ гена (Me (Q ₂₅ / Q ₇₅))		
	группа 1 (n = 101)	группа 2 (n = 32)	группа 3 (n = 91)
<i>COL1A1</i>	124,5 (17,9 / 576,2)	137,2 (22,6 / 614,2)	95,7 (12,4 / 427,6)
<i>COL1A2</i>	451,7 (92,1 / 1283,2)	463,1 (103,7 / 1422,6)	254,3 (71,4 / 862,7)
<i>LOX</i>	78,6 (8,7 / 267,4)	84,1 (22,6 / 308,7)	73,1 (7,2 / 221,5)
<i>P3H1</i>	15,3 (10,2 / 63,4)	16,1 (9,4 / 67,2)	14,8 (7,9 / 55,6)
<i>ELN</i>	34,3 (0,0 / 61,4)	42,1 (0,0 / 84,1)	26,1 (0,0 / 56,9)

Анализ наличия связи между клиническими признаками поражения кожи (морфотип ≥ 2 балла, изменения в подкожно-жировой клетчатке ≥ 1 балл, птоз ≥ 1 балл) и морфологическими изменениями (атрофия эпидермиса, утолщение и гомогенизация коллагеновых волокон, эластоз, изменение эластических волокон) проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия χ^2 -Пирсона. В результате была выявлена достоверная ассоциация между клиническими проявлениями и морфологическими характеристиками у пациенток с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи ($p < 0,05$).

Далее был проведен анализ взаимосвязи уровней нормализованной экспрессии генов, контролирующих синтез коллагена и эластина (*COL1A1*, *COL1A2*, *LOX*, *P3H1*, *ELN*), и морфологических характеристик кожи у обследованных с хроническими дерматозами. Морфологические характеристики кожи были разделены на 2 группы: наличие изменений (атрофия эпидермиса; утолщение или гомогенизация коллагеновых волокон; эластоз; состояние эластических волокон) любой степени против отсутствия изменений. Для гена *ELN* признак рассматривался как номинальный, т. к. его экспрессия в 43,75 % случаев была равна 0. По результатам проведенного однофакторного анализа можно сделать вывод, что шанс наличия атрофии эпидермиса у пациентов с хроническими дерматозами достоверно выше при снижении экспрессии генов *COL1A1* ($p = 0,047$), *COL1A2* ($p = 0,042$), *LOX* ($p = 0,039$) (таблица 6). Для других генов не выявлено влияния уровня нормализованной экспрессии на наличие атрофии эпидермиса ($p > 0,05$).

Таблица 6. — Ассоциация экспрессии генов, контролирующих синтез коллагена и эластина, с атрофией эпидермиса

Ген	Атрофия эпидермиса		p
	наличие изменений (n = 197)	отсутствие изменений (n = 27)	
<i>COL1A1</i>	87,1 (16,3 / 133,4)	286,2 (149,7 / 627,6)	0,047
<i>COL1A2</i>	145,6 (84,3 / 227,1)	621,6 (352,1 / 1520,8)	0,042

Продолжение таблицы 6

Ген	Атрофия эпидермиса		p
	наличие изменений (n = 197)	отсутствие изменений (n = 27)	
<i>LOX</i>	54,7 (3,4 / 67,9)	62,5 (49,7 / 311,4)	0,039
<i>P3H1</i>	15,4 (10,2 / 62,7)	16,3 (11,5 / 30,8)	0,243
<i>ELN</i> >0, n (%)	109 (55,33 %)	17 (62,96 %)	0,511

Далее в качестве ранжирующего фактора был использован критерий наличия или отсутствия утолщения или гомогенизации коллагеновых волокон. По результатам статистического анализа можно сделать вывод, что шанс наличия изменений в структуре коллагеновых волокон у пациентов с хроническими дерматозами достоверно выше при снижении экспрессии генов *COL1A1* ($p = 0,044$), *COL1A2* ($p = 0,047$), *LOX* ($p = 0,032$) (таблица 7). Для других генов не выявлено влияния уровня нормализованной экспрессии на наличие утолщения или гомогенизации коллагеновых волокон ($p > 0,05$).

Таблица 7. — Ассоциация экспрессии генов, контролирующих синтез коллагена и эластина, с утолщением или гомогенизацией коллагеновых волокон

Ген	Изменения в коллагеновых волокнах		p
	наличие изменений (n = 214)	отсутствие изменений (n = 10)	
<i>COL1A1</i>	85,2 (13,3 / 137,2)	289,2 (151,7 / 626,6)	0,044
<i>COL1A2</i>	141,6 (82,3 / 215,3)	630,1 (349,1 / 1489,4)	0,047
<i>LOX</i>	52,9 (3,7 / 69,5)	63,5 (47,6 / 315,6)	0,032
<i>P3H1</i>	14,8 (10,1 / 64,3)	15,6 (12,5 / 32,5)	0,415
<i>ELN</i> >0, n (%)	124 (57,94 %)	6 (60,0 %)	0,324

На следующем этапе в качестве ранжирующего фактора был использован критерий наличия или отсутствия у пациентов эластоза. По результатам статистического анализа можно сделать вывод, что шанс наличия эластоза у пациентов с хроническими дерматозами достоверно выше при снижении экспрессии генов *COL1A1* ($p = 0,031$), *COL1A2* ($p = 0,027$), *LOX* ($p = 0,044$) (таблица 8). Для других генов не выявлено влияния уровня нормализованной экспрессии на наличие утолщения или гомогенизации коллагеновых волокон ($p > 0,05$).

Таблица 8. — Ассоциация экспрессии генов, контролирующих синтез коллагена и эластина, с эластозом

Ген	Эластоз		p
	наличие изменений (n = 202)	отсутствие изменений (n = 22)	
<i>COL1A1</i>	84,8 (14,1 / 134,6)	290,1 (153,4 / 627,1)	0,031
<i>COL1A2</i>	142,1 (83,3 / 217,1)	632,1 (347,1 / 1491,6)	0,027
<i>LOX</i>	54,7 (3,9 / 67,5)	65,2 (49,1 / 314,2)	0,044
<i>P3H1</i>	14,6 (10,4 / 64,8)	14,2 (13,7 / 35,2)	0,357
<i>ELN</i> >0, n (%)	109 (53,96 %)	13 (59,09 %)	0,241

При использовании состояния эластических волокон в качестве ранжирующего фактора не выявлено влияния уровня нормализованной экспрессии генов *COL1A1*, *COL1A2*, *LOX*, *P3H1*, *ELN* на данный морфологический показатель ($p > 0,05$).

При проведении многофакторного анализа было установлено, что шанс наличия морфологических изменений (атрофия эпидермиса и/или изменение коллагеновых волокон и/или эластоз) в коже у пациенток с хроническими дерматозами возрастал со снижением экспрессии генов *COL1A1* менее 100 % (ОШ 1,20 (95 % ДИ 1,03–1,34), $p = 0,026$) и/или гена *COL1A2* менее 200 % (ОШ 6,13 (95 % ДИ 1,07–9,04), $p = 0,034$), и/или гена *LOX* менее 50 % (ОШ 6,31 (95 % ДИ 2,57–9,55), $p = 0,027$) (таблица 9).

Таблица 9. — Результаты многофакторного анализа влияния экспрессии генов *COL1A1*, *COL1A2*, *LOX* на шанс наличия морфологических изменений в коже у пациентов с хроническими дерматозами

Переменная	b	ОШ (95 % ДИ ОШ)	p
<i>COL1A1</i>	0,11	1,20 (1,03–1,34)	0,026
<i>COL1A2</i>	1,12	6,13 (1,07–9,04)	0,034
<i>LOX</i>	2,42	6,31 (2,57–9,55)	0,027

Заключение. В ходе выполнения исследований определена достоверная ассоциация клинических проявлений и морфологических характеристик биоптатов кожи у пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи лица. Установлено, что наличие морфологических изменений в коже обследованных с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи лица, ассоциировано с уровнями нормализованной экспрессии гена *COL1A1* менее 100 % ($p < 0,05$) и/или гена *COL1A2* менее 200 % ($p < 0,05$) и/или гена *LOX* менее 50 % ($p < 0,05$). Это позволяет рекомендовать использование метода ПЦР-РВ для объективной оценки степени изменений в коже у пациентов с хроническими дерматозами без проведения трудоемких и субъективных исследований с использованием гистологического метода.

Литература

1. Fett, N. Update on morphea: part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis / N. Fett, V. P. Werth // J. Am. Acad. Dermatol. — 2011. — Vol. 64, № 2. — P. 217–228.
2. Волнухин, В. А. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных локализованной склеродермией / В. А. Волнухин // Дерматовенерология / под ред. А. А. Кубановой. — М.: ДЭКС-Пресс, 2010. — С. 52–68.
3. Сравнительная оценка морфологических признаков атрофических изменений соединительной ткани дермы при заболеваниях, сопровождающихся атрофией кожи / Н. В. Клименкова [и др.] // Дерматовенерология. Косметология. — 2017. — Т. 3, № 2. — С. 121–134.
4. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов // М.: Медицина, 1969. — 422 с.
5. Метод определения уровней экспрессии генов, обеспечивающих синтез коллагена и эластина, в биоптатах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи / С. А. Костюк [и др.] // Дерматовенерология. Косметология. — 2017. — № 2. — С. 179–187.

MOLECULAR-GENETIC MARKERS OF SKIN ATROPHY DETERMINATION IN PATIENTS WITH CHRONIC DERMATOSIS

Rudenkova T. V., Kostiuk S. A., Shimanskaya I. G.

State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”, Minsk, Republic of Belarus

The connection between skin structural alterations and activity variations of genes controlling collagen and elastin synthesis in patients with chronic dermatosis occurred with face skin atrophy is not well known. Morphological alterations in skin of patients with chronic dermatosis are associated with genes normalized expression level decreasing: gene *COL1A1* less than 100 % and/or gene *COL1A2* less than 200 % and/or gene *LOX* less than 50 %. Real-time PCR with reverse transcription can be used for objective alteration rate estimation in skin of patients with chronic dermatosis.

Keywords: chronic dermatosis, skin morphotype, morphological feature, genes.