Voitiv, Y. Y., & Smorzhevskyi, V. Y. (2024). Analysis of the genetic determination of developing eventration in patients with abdominal surgical pathology. *Actual Issues of Modern Science. European Scientific e-Journal, 31*, 156-163. Ostrava: Tuculart Edition, European Institute for Innovation Development. (In Ukrainian)

DOI: 10.47451/med2024-05-02

The paper is published in Crossref, ICI Copernicus, BASE, Zenodo, OpenAIRE, LORY, Academic Resource Index ResearchBib, J-Gate, ISI International Scientific Indexing, ADL, JournalsPedia, Scilit, EBSCO, Mendeley, and WebArchive databases.

Yaroslav Y. Voitiv, Doctor of Medical Science, Associate Professor, Department of Surgery and Transplantology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine.
ORCID 0000-0003-2638-9352
Valentyn Y. Smorzhevskyi, Doctor of Medical Science, Professor, Department of Surgery and Transplantology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine.
ORCID 0000-0001-8410-3944

Analysis of the genetic determination of developing eventration in patients with abdominal surgical pathology

Abstract: Eventration is one of the most dangerous complications in abdominal surgery, which occurs in 0.2-7% (2% on average) of patients after laparotomy. The event leads to the development of intestinal obstruction, postoperative peritonitis, and the formation of intestinal fistulas. Despite the fact that the role of impaired regeneration and repair processes in the occurrence of events is undeniable, scientific publications and research at the modern methodological level on this topic are insufficient, and existing ones mainly concern the development of postoperative ventral hernias. The purpose of the study was to conduct an analysis of genetic determination of the development of eventrations, based on the frequency of polymorphic variants of matrix metalloproteinase-2 ($C^{-1306}\rightarrow T$) (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 ($G^{303}\rightarrow A$) (TIMP-2) genes. The subjects of the study were 19 patients with eventrations and 44 patients with connective tissue pathology. The data obtained by us from the study of polymorphic variants of the MMP-2 ($C^{-1306}\rightarrow T$) and TIMP-2 ($G^{303}\rightarrow A$) genes in the Ukrainian population generally correspond to the population frequencies in the European population and the USA. All models of inheritance were analyzed, and the best model with the lowest Aikaike information criterion was determined, which turned out to be a recessive model. As a result of the genetic and statistical analysis of polymorphism of MMP-2 ($C^{-1306}\rightarrow T$) and TIMP-2 ($G^{303}\rightarrow A$) genes, it was established that polymorphic variants of these genes are not reliably associated with the development of eventration.

Keywords: postoperative complications, eventration, MMP-2, TIMP-2, genetic determination.

Ярослав Юрійович Войтів, доктор медичних наук, доцент, кафедра хірургії та трансплантології, Национальный университет здравоохранения Украины имени П. Л. Шупика. Київ, Україна.
ORCID 0000-0003-2638-9352
Валентин Йосипович Сморжевський, доктор медичних наук, професор, кафедра хірургії та трансплантології, Национальный университет здравоохранения Украины имени П. Л. Шупика. Київ, Україна.
ORCID 0000-0001-8410-3944

Аналіз генетичної детермінації розвитку евентрацій у хворих з абдомінальною хірургічною патологією

Анотація: Евентрація – це одне з найбільш небезпечних ускладнень в абдомінальній хірургії, яке зустрічається у 0,2-7% (2% в середньому) пацієнтів після лапаротомій. Евентрація призводить до розвитку кишкової непрохідності, післяопераційного перитоніту, формування кишкових нориць. Не дивлячись на те, що роль порушення регенераційних та репараційних процесів у виникненні евентрацій є безсумнівною, наукових публікацій та досліджень на сучасному методичному рівні на цю тему недостатньо, а існуючі, переважно стосуються розвитку післяопераційних вентральних гриж. Метою дослідження було провести аналіз генетичної детермінації розвитку евентрацій, на основі частоти поліморфних варіантів генів матриксної металопротеїнази-2 (C^{-1306}→T) (MMP-2) та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази-2 (G^{303}→A) (TIMP-2). Об'єктом дослідження були 19 пацієнтів з евентраціями та 44 пацієнти з патологією сполучної тканини. Отримані нами дані дослідження поліморфних варіантів генів MMP-2 (C^{-1306} →T) та TIMP-2 (G^{303}→A) в українській популяції, в цілому, відповідають популяційним частотам у європейській популяції та США. Проаналізовано усі моделі успадкування, та визначено найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке, якою виявилась рецесивна модель. У результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму генів MMP-2 (C^{-1306} →T), та TIMP-2 (G^{303}→A) встановлено, що поліморфні варіанти вказаних генів достовірно не асоціюють з розвитком евентрації.

Ключові слова: післяопераційні ускладнення, евентрація, MMP-2, TIMP-2, генетична детермінація.

Вступ

Евентрація – це очеревинний та м'язово-апоневротичний дефект черевної стінки після лапаротомії, внаслідок чого створюються умови для розгерметизації черевної порожнини і виходу внутрішніх органів за її межі (*Rodríguez-Hermosa et al., 2005*; *Бойко та ін., 2022*).

Це одне з найбільш небезпечних ускладнень в абдомінальній хірургії, яке зустрічається у 0,2-7% (2% в середньому) пацієнтів після лапаротомій (*Gembal et al., 2006*). Евентрація призводить до розвитку кишкової непрохідності, післяопераційного перитоніту, формування кишкових нориць (*Marjanovic & Hopt, 2011*).

Найчастішими факторами ризику є: вік старше 65 років, нестабільна гемодинаміка, підвищений внутрішньочеревний тиск, ургентні операції, гіпопротеїнемія, анемія, операції на товстій кишці та інші. Окремо виділяють місцеві сприяючі фактори, такі як: недосконалість хірургічної техніки, невірна тактика хірурга при закритті лапаротомної рани. Однією з причин, яка найчастіше викликає евентрацію є нагноєння післяопераційної рани (*Colozzi et al., 2016*).

Не дивлячись на те, що роль порушення регенераційних та репараційних процесів у виникненні евентрацій є безсумнівною, наукових публікацій та досліджень на сучасному методичному рівні на цю тему недостатньо, а існуючі, переважно стосуються розвитку післяопераційних вентральних гриж (*Harrison et al., 2016*).

Необхідне поглиблене вивчення механізмів репарації та причин її порушень в ділянці формування післяопераційного рубця.

З огляду на майже не досліджену роль генетичної схильності у розвитку післяопераційних ускладнень, а саме, евентрацій, ми задались метою вивчити поліморфізм генів, що кодують матриксну металопротеїназу 2-го типу (MMP-2) та тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ 2-го типу (TIMP-2) у даної групи хворих. Обрання саме цих генів не було випадковим — ми керувалися основними відомими патофізіологічними механізмами, які беруть участь у формуванні післяопераційного рубця (*Visse & Nagase, 2003*).

Матриксні металопротеїнази (MMP) – це група ензимів, представлена цистеїновими, сериновими, аспартильними і металозалежними протеїназами. MMP відіграють основну роль в обміні білків сполучної тканини, беруть участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах. MMP-2,9 виявляють високу спорідненість до колагену IV типу, тому іноді їх називають колагеназами IV типу. MMP-2 займають центральну позицію в регулюванні балансу між процесами синтезу та протеолізу в позаклітинному матриксі, впливають на реалізацію фізіологічних процесів та патологічних змін в організмі. Основними регуляторами матриксних металопротеїназ є тканинні інгібітори металопротеїназ – TIMP. Усі 4 групи TIMP здатні пригнічувати протеоліз латентних форм та інгібувати активні форми MMP, але TIMP-1 активніший щодо MMP-9, а TIMP-2 виявляє специфічність стосовно MMP-2 (*Fassina et al., 2000*).

Автори задались метою провести аналіз генетичної детермінації розвитку евентрацій, на основі частоти поліморфних варіантів генів матриксної металопротеїнази-2 (C^{-1306}→T) (MMP-2) та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази-2 (G^{303}→A) (TIMP-2).

Об'єктом дослідження були 63 пацієнти, що лікувались у ДУ «ННЦХТ імені О.О. Шалімова», з яких 19 хворих з післяопераційними евентраціями, 44 пацієнти з фенотипічними ознаками недиференційованої дисплазії сполучної тканини (НДСТ). Для оцінки поліморфізму генів в популяції обстежено 80 практично здорових людей, які співставні за віком і статтю з досліджуваними. Недиференційовану дисплазію сполучної тканини діагностували за напрацьованою методикою (патент України на корисну модель №120158 UA). Ступінь дисплазії оцінювали за оригінальною клінічною скринінг-шкалою, напрацьованою на основі таблиці критеріїв вираженості дисплазії сполучної тканини за Т.Ю. Смольновою (2003) (*Voitiv et al., 2020*).

Генетичні дослідження проводили в лабораторії відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Забір букального епітелію проводився з використанням букальних щіток з наступним заморожуванням зразків та їх зберіганням при температурі -20°C. ДНК для генотипування екстрагували із зразків з використанням наборів Diatom™ Prep 200, відповідно до протоколу виробника.

Методом ПЛР у реальному часі досліджували наступні поліморфізми: C^{-1306} →T (MMP2), rs243865 та G^{303}→A (TIMP2), rs9900972. Реакції ампліфікації проводили з використанням Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США) в кінцевій реакції об'ємом 20 мкл, який містив 2X TaqMan Універсальний Master Mix (Applied Biosystems, США), assay C_1792560_10 і матричну ДНК. Ампліфікація фрагментів генів складалася зі стадії денатурації при 95°C протягом 20 с, а потім 40 циклів ампліфікації при 95°C протягом 3 с і 60°C протягом 30 сек. Аналіз даних проводився з 7500 Fast Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Основну частину статистичного аналізу було проведено з використанням програми «Statistica 9.0» (SPSS) та Excel 2016. Номінальні дані подано у вигляді кількісних та відсоткових значень. Достовірність відмінностей середніх величин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного статистичного аналізу. Відповідність розподілу генотипів перевіряли за допомогою тесту Харді – Вайнберга. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували χ2-критерій Пірсона.

Результати дослідження

У досліджуваній групі пацієнтів з евентраціями, переважну більшість склали хворі після ургентних операцій з приводу поширеного перитоніту (5), гострої кишкової непрохідності (6), деструктивного панкреатиту (4), торакоабдомінальної травми (2), резекційних операцій на товстій кишці (2).

В обстежених нами пацієнтів з евентраціями травлення ознаки НДСТ виявлені у 11 (63,6%) пацієнтів. Найчастіше зустрічались наступні фенотипічні синдроми НДСТ: вісцеральний (85,7%) та аритмічний (57,2%) синдроми.

З метою виявлення можливої асоціації поліморфних варіантів генів ММР-2 (C^{-1306} →T), та TIMP2 (G^{303}→A) із ризиком розвитку зовнішніх кишкових нориць був проведений однофакторний статистичний аналіз частоти генотипів у досліджуваних групах пацієнтів (*Таблиця 1*).

При аналізі моделей успадкування гену ММР-2 (C^{-1306}→T), а саме: кодомінантної, домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної у групах контролю (n=80) та дослідної групи 1 з фенотипічними ознаками НДСТ (n=44) виявлено, що розподіл генотипів відповідає закону Харді- Вайнберга (p>0,05). Використавши тест χ^2 із 2 ступенями свободи, нам не вдалося виявити статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі хворих та в групі практично здорових людей (p>0,05).

Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке. Такою моделлю виявилася рецесивна модель, для якої в таблиці нижче наведені значення відношення шансів, статистична значущість, а також інформаційний критерій Айкайке (*Таблиця 2*).

Аналіз мультиплікативної моделі успадкування гену ММР-2 (C^{-1306}→T), при порівнянні групи контролю (n=80) та дослідної групи 2 з евентраціями (n=11) засвідчив відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга (p>0,05). Використавши тест χ^2із 2 ступенями свободи ми не знайшли статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі хворих та в групі практично здорових людей (p>0,05).

Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке (*Таблиця 3*)

При аналізі частоти алельного поліморфізму гену ММР-2 виявлено, що носіїв домінуючого в усіх групах CC-генотипу було найбільше у групі з фенотипічними ознаками НДСТ (дослідна 1): 59,1% проти 47,5% (p>0,05) в контролі (*Діаграма 1*). Тоді як носіїв гомозиготного TT-генотипу, в дослідній 1 групі, було більш як вдвічі менше (4,5% проти 10% (p>0,05)). У дослідних 2 групі з евентраціями розподіл частоти поліморфізму промотору гену ММР-2, загалом, відповідав показникам контрольної групи по CC, CT і

ТТ варіантам. При порівнянні з дослідною 1 групою (фенотипічні ознаки НДСТ) розподіл співпадав по СС і СТ алелям, носіїв гомозиготного ТТ генотипу було вдвічі менше (4,5% проти 9,1% (p>0,05)).

При аналізі моделей успадкування TIMP-2 (G^{303}→A), у групах контролю (n=80) та дослідної групи 1 з фенотипічними ознаками патології сполучної тканини (n=44) нам не вдалося виявити статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі хворих та у групі практично здорових людей (p>0,05) (*Таблиця 4*).

При аналізі алельного поліморфізму промотору гена TIMP-2 (G^{303}→A), у групах контролю (n=80) та дослідної групи 2 з евентраціями (n=11) відмінності частоти розподілу генотипів були на статистично недостовірними.

Відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга у дослідній 2 групі була перевірена з допомогою тесту χ^2 із 1 ступенем свободи, без використання корекції Йетса. Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке (*Таблиця 5*).

В обстеженій популяції у групі контролю та у дослідній групі 1 розподіл носіїв GG, GA та AA генотипів загалом був схожим (*Діаграма 2*). Проте, у групі пацієнтів з евентраціями (дослідна 2) розподіл носіїв генотипів GG, GA відрізнявся. Так, гомозиготний GG варіант домінував у контрольній та дослідній 1 групі (50% та 54,5% відповідно), тоді як у групі пацієнтів з евентраціями гомозиготний GG та гетерозиготний GA генотип зустрічався однаково часто (45,5%). Гетерозиготний GA генотип у дослідній групі 2 зустрічався удвічі рідше, ніж у контролі (21,1% проти 40%, p=0,057) та в 1,6 рази рідше ніж у дослідній 1 групі (p>0,05). Кількість носіїв гомозиготного AA генотипу в досліджуваних групах суттєво не відрізнялись (*Діаграма 2*).

Отримані нами дані дослідження поліморфних варіантів генів MMP-2 (C^{-1306} →T) та TIMP-2 (G^{303}→A) в українській популяції (n=80), в цілому, відповідають популяційним частотам у європейській популяції та США (*Xu et al., 2004*). При цьому, ми встановили суттєві відмінності при порівнянні з популяціями африканської та азіатської раси (*Li et al., 2010*). Цікавим є те, що у вказаних популяціях частота основного C алеля гена MMP-2 (rs243865) становила 93,7% (Африка) та 90% (Азія), що значно перевищує показники нашої контрольної групи (76%) та європейської популяції (75,5%). Тоді як, мінорний T алель зустрічався у 24% контрольної групи, і в 10% (Азія) та 6,7% (Африка), відповідно.

При аналізі частоти алельного поліморфізму гена MMP-2 та TIMP-2 у дослідній групі 2 не було виявлено статистично достовірних відмінностей у порівнянні з контролем. Розподіл частоти поліморфізму промотору гену MMP-2, загалом, відповідав показникам контрольної групи по CC, CT і TT варіантам.

Дискусія

У результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму генів MMP-2 (C^{-1306}→T), та TIMP-2 (G^{303}→A) встановлено, що поліморфні варіанти вказаних генів достовірно не асоціюють з розвитком евентрації.

Враховуючи роль матриксних металопротеїназ та їх інгібіторів у процесах синтезу та протеолізу, ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу, обміні білків сполучної

тканини, здатність впливати на проникність судинної стінки та ангіогенез актуальність їх вивчення у контексті патогенезу виникнення евентрацій є безсумнівною.

Виявлені нами особливості алельних варіантів генів MMP-2 (C^{-1306} →T), та TIMP-2 (G^{303}→A) у групах пацієнтів з евентраціями та патологією сполучної тканини є підставою для подальшого вивчення та пошуку молекулярно-генетичних маркерів, що кодують основні ланки патогенезу післяопераційних ускладнень.

Висновки

Таким чином, алельний поліморфізм промотору генів MMP-2 (C^{-1306}→T) та TIMP-2 (G^{303}→A) у пацієнтів з евентраціями статистично вірогідно не відрізняться від показників контрольної групи.

Розвиток евентрацій не підтвердив наявність генетичного тригера з боку досліджених поліморфізмів, що може свідчити про підтвердження класичної теорії патогенезу цього ускладнення, а саме ранева інфекція, технічні помилки, різкі метаболічні порушення тощо.

Молекулярно-генетичні дослідження є новим перспективним напрямом для напрацювання сучасних персоніфікованих діагностичних критеріїв та моделей прогнозування розвитку та перебігу післяопераційних ускладнень.

Список джерел інформації:

Бойко, В. В. та ін. (2022). Профілактика евентрацій після повторних операцій на органах черевної порожнини. *Харківська хірургічна школа*, *2*(53), 11-12. (In Ukrainian) [Boyko, V. V. et al. (2022). Prevention of events after repeated operations on the abdominal organs. *Kharkiv Surgical School*, *2*(53), 11-12.]

Colozzi, S. et al. (2016). Early postoperative eventration: Surgical treatment with use of biological prosthesis. *Journal of Clinical Case Report*, 1-6. https://doi.org/10.4172/2165-7920.1000773

Fassina, G., Ferrari, N., & Brigati, C. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. *Clinical & Experimental Metastasis*, *18*, 111-120.

Gembal, P. et al. (2006). Eventrations--the prospective analysis of risk factors of eventrations patients after laparotomy treated in 8 surgical departments of Podkarpacie District. *Wiad Lek*, *59*, 767-771.

Harrison, B., Sanniec, K., & Janis, J. E. (2016). Collagenopathies-implications for abdominal wall reconstruction: A systematic review. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, *4*(10), 1036. https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001036

Li, Y. et al. (2010). Association of functional polymorphisms in MMPs genes with gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma in high incidence region of North China. *Molecular Biology Reports*, *37*(1), 197-205.

Marjanovic, G., & Hopt, U. (2011). Physiologie der Anastomosenheilung. *Chirurg*, *82*, 41-47 (2011). (In German). https://doi.org/10.1007/s00104-010-1898-2

Rodríguez-Hermosa, J. I. et al. (2005) Risk factors for acute abdominal wall dehiscence after laparotomy in adults. *Cirugia espanola*, *77*, 280-286.

Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Cardiovascular Research*, 2, 827-839.

Voitiv, Y. et al. (2020). Analysis of polymorphism of matrix metalloproteinase-2 (C-1306→T) and tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) genes in patients with anastomotic leak in hollow digestive organs. *Georgian Medical News*, *307*, 7-12. PMID: 33270569.

Xu, E. et al. (2004). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*, 999-1003.

Додатки

Таблиця 1. Розподіл поліморфних варіантів генів MMP-2 (C^{-1306} →T), rs243865 та TIMP-2 (G^{303}→A), rs9900972 у досліджуваних групах

Досліджуваний ген		Контрольна група n=80 (%)	Дослідна група 1 (з фенотипічними ознаками ДСТ) n=44 (%)	Дослідна група 2 (з евентраціями) n=19 (%)
MMP-2 (C^{-1306} →T)	**CC**	38 (47,5%)	26 (59,1%)	10 (54,5%)
	CT	34 (42,5%)	16 (36,4%)	6 (36,4%)
	TT	8 (10%)	2 (4,5%)	3 (9,1%)
Тест Харді–Вайнберга (χ^2, p)		χ^2=0,01, p>0,05	χ^2=0,05, p>0,05	χ^2=0,01, p>0,05
Тест χ^2, (χ^2, p)		-	χ^2=2,051, p>0,05	χ^2=0,195, p>0,05
TIMP-2 (G^{303}→A),	**GG**	50 (50%)	24 (54,5%)	8 (45,5%)
	GA	32 (40%)	15 (34,1%)	8 (45,5%)
	AA	8 (10%)	5 (11,4%)	3 (9,1%)
Тест Харді–Вайнберга (χ^2, p)		χ^2=0,18, p>0,05	χ^2=1,15, p>0,05	χ^2=0,18, p>0,05
Тест χ^2, (χ^2, p)		-	χ^2=0,425, p>0,05	χ^2=0,119, p>0,05

Таблиця 2. Відношення шансів для рецесивної моделі успадкування пацієнтів з фенотипічними ознаками НДСТ. Відношення шансів з 95% довірчим інтервалом

Генотип	Контрольна група n=80 (%)	Дослідна група 1 (з фенотипічними ознаками НДСТ) n=44 (%)	Відношення шансів	p-value	AIC
CC+CT	72 (90%)	42 (95.5%)	1.00		
TT	8 (10%)	2 (4.5%)	0.43 (0.06 - 1.81)	0.3	16.12

Таблиця 3. Відношення шансів для рецесивної моделі успадкування у пацієнтів з евентраціями. Відношення шансів з 95% довірчим інтервалом

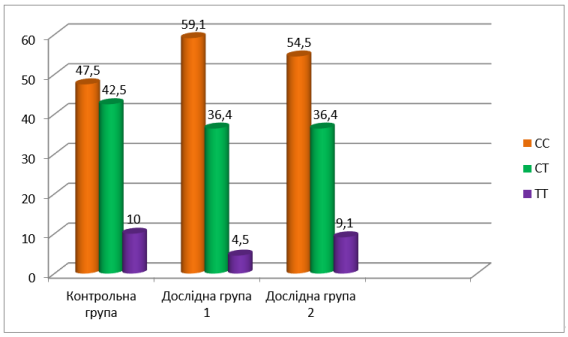
Генотип	Контрольна група n=80 (%)	Дослідна група 2 (з евентраціями) n=19 (%)	Відношення шансів	p-value	AIC
CC+CT	72 (90%)	17 (90.9%)	1.00		
TT	8 (10%)	2 (9.1%)	0.9 (0.05 - 5.71)	0.92	12.74

Таблиця 4. Відношення шансів для рецесивної моделі успадкування у пацієнтів з фенотипічними ознаками НДСТ. Відношення шансів з 95% довірчим інтервалом

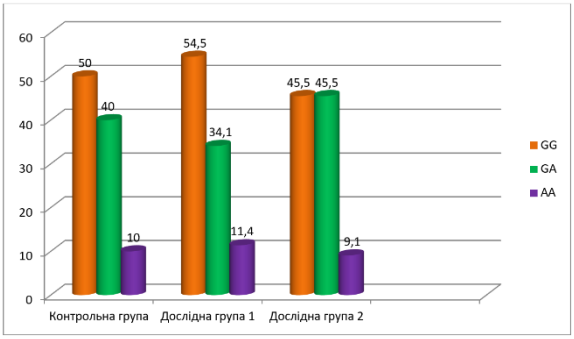
Генотип	Контрольна група n=80 (%)	Дослідна група 1 (з фенотипічними ознаками НДСТ) n=44 (%)	Відношення шансів	p-value	AIC
GG+GA	72 (90%)	39 (88.6%)	1.00		
AA	8 (10%)	5 (11.4%)	1.15 (0.33 - 3.7)	0.81	16.1

Таблиця 5. Відношення шансів для рецесивної моделі успадкування у пацієнтів з евентраціями. Відношення шансів з 95% довірчим інтервалом

Генотип	Контрольна група n=80 (%)	Дослідна група 2 (з евентраціями) n=19 (%)	Відношення шансів	p-value	AIC
GG+GA	72 (90%)	17 (90.9%)	1.00		
AA	8 (10%)	2 (9.1%)	0.9 (0.05 - 5.71)	0.92	12.69



Діаграма 1. Розподіл частоти алельного поліморфізму (%) промотору (C-1306 →T) гену MMP-2



Діаграма 2. Розподіл частоти алельного поліморфізму (%) промотору (G303→A) гену TIMP-2