

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Aspecte genetice în remanierea cicatricială

---

Doctorand: **Roxana Flavia Ilies**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ioan Victor Pop**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>15</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Cicatrizarea fiziologică</b>	<b>19</b>
<b>2. Cicatrizarea patologică</b>	<b>21</b>
2.1 Aspecte clinice ale cicatricilor patologice	21
2.1.1 Cicatricile atroifice	21
2.1.2 Cicatricile hipertroifice	21
2.1.3 Cicatricile cheloide	22
<b>3. Factori genetici ce influențează cicatrizarea</b>	<b>25</b>
3.1 Justificarea studierii predispoziției genetice de cicatrizare patologică	25
3.2 Genetica factorilor de creștere	26
3.3 Genetica angiogenezei cicatriciale	27
3.4 Genetica apoptozei	28
3.5 Ținte perspective ale studiului geneticii cicatricilor	28
<b>4. Abordarea terapeutică a cicatricilor patologice</b>	<b>29</b>
4.1 Evaluarea și planul de tratament al cicatricilor patologice	29
4.2 Farmacoterapia cicatricilor patologice	29
4.3 Alte opțiuni în terapia cicatricilor patologice	30
4.4 Terapii în curs de cercetare	30
<b>5. Impactul cicatrizării patologice asupra calității vieții</b>	<b>33</b>
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru și obiective</b>	<b>37</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>39</b>

<b>3. Studiul 1. Impactul variantelor polimorfice ale COL5A2 și TGF- <math>\beta</math>1 în cicatrizarea patologică</b>	49
3.1 Introducere	49
3.2 Material și metodă	50
3.2.1 Genotiparea	50
3.2.2 Analiza statistică	53
3.3 Rezultate	54
3.3.1 Studiul datelor demografice și clinice	54
3.3.2 Analiza polimorfismului rs369072636 al COL5A2	62
3.3.3 Analiza polimorfismelor rs201700967 și rs200230083 al TGF- $\beta$ 1	62
3.4 Discuții	62
3.5 Concluzii	68
<b>4. Studiul 2. Impactul alelelor nule GSTT1/GSTM1 în cicatrizarea patologică</b>	71
4.1 Introducere	71
4.2. Material și metodă	71
4.2.1 Genotiparea	72
4.2.2 Analiza statistică	73
4.3 Rezultate	73
4.3.1 Date demografice și clinice	73
4.3.2 Analiza alelelor nule GSTT1/GSTM1	75
4.3.3 Analiza alelelor nule GSTT1/GSTM1 în corelație cu parametri clinici	76
4.4 Discuții	76
4.5 Concluzii	79
<b>5. Studiul 3. Impactul polimorfismului rs2228570 al VDR în cicatrizarea patologică</b>	81
5.1 Introducere	81
5.2 Material și metodă	82
5.2.1 Genotiparea	82
5.2.2 Analiza statistică	83
5.3 Rezultate	84
5.3.1 Analiza variantei polimorfice a VDR	84

---

5.3.2 Analiza variantei polimorfice a VDR în corelație cu parametri clinici	84
5.4 Discuții	85
5.5 Concluzii	89
<b>6. Studiul 4. Impactul polimorfismului rs2736100 al hTERT în cicatrizarea patologică</b>	91
6.1 Introducere	91
6.2 Material și metodă	92
6.2.1 Genotiparea	92
6.2.2 Analiza statistică	93
6.3 Rezultate	94
6.3.1 Analiza polimorfismului rs2736100 al hTERT	94
6.3.2 Analiza polimorfismului rs2736100 al hTERT în corelație cu parametri clinici	94
6.4 Discuții	95
6.5 Concluzii	98
<b>7. Discuții generale</b>	99
<b>8. Concluzii generale</b>	103
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	105
<b>REFERINȚE</b>	107

## INTRODUCERE

Cicatrizarea reprezintă o componentă a procesului fiziologic de reparare a tegumentului ca urmare a unei leziuni, fiind un fenomen experimentat de majoritatea persoanelor într-un anumit punct al vieții. Cicatrizarea fiziologică culminează cu apariția unei cicatrici fine, alb-sidefii, suple, cu impact estetic minim și fără vreun impact funcțional.

În stadiul de remaniere, rezultatul fiziologic al cicatrizării se bazează pe un echilibru fragil între constituirea componentelor necesare vindecării și descompunerea acestora. O serie de variabile, începând cu aspecte mecanice (poziția și tensiunea la nivelul țesutului lezat) și conducând până la aspecte intrinseci (tendința unor pacienți de a sintetiza colagen în exces) pot altera acest echilibru, determinând cicatrici patologice.

Spectrul cicatrizării patologice cuprinde cicatricile atroifice, marcate printr-o fragilitate a tegumentului nou format, cu un impact estetic semnificativ, precum și cicatrici hipertrofice și cheloide, care se situează la polul opus: cel al țesutului cicatricial reprezentat excesiv. Acesta poate avea atât consecințe estetice marcate precum și consecințe funcționale: de la discomfort local până la anchiloza articulară cauzată de limitarea mișcărilor segmentului afectat.

Forma cea mai severă de cicatrizare patologică este cicatrizarea de tip cheloid, unde proliferarea țesutului cicatricial depășește limitele inițiale ale leziunii. Incidența apariției acestui tip de cicatrici este mai mare în rândul pacienților afro-americieni, prezentând o agregare familială notabilă. Mai mult decât atât, la nivel molecular, cicatricile cheloide se comportă similar cu o formațiune tumorală benignă.

Procesul de cicatrizare este unul de lungă durată, prima oportunitate de a evalua rezultatul cicatrizării fiind la 6 luni din momentul lezării tegumentului. În decursul procesului de analiză a cicatrizării desfășurat pe lotul de pacienți cuprinși în prezenta cercetare, s-a observat tendința unor cicatrici de a prezenta aspecte patologice la un interval de observație de 3 luni, cu normalizarea cicatricii la momentul final de observație la 6 luni. Diametral opus, o parte din cicatricile patologice supuse analizei au cunoscut un proces de vindecare aparent fiziologic la interval de 3 luni.

Din acest motiv, în mod convențional, terapia cicatricilor patologice se inițiază după maturarea și diagnosticul acestora. Demersurile terapeutice implică injecții locale cu corticoizi, proceduri laser sau reintervenție chirurgicală. Parcursul terapeutic este unul de lungă durată, costisitor și cu o rată de succes relativ slabă.

Aspectele sus-menționate justifică investigarea cicatricilor patologice din prisma fondului genetic al pacientului. Conturarea portretului genetic al pacientului predispus spre cicatrizare patologică permite profilaxia per primam a cicatricii patologice, precum și planificarea pre-operatorie a inciziei, având în vedere menținerea unei tensiuni mecanice scăzute la nivelul inciziei.

Literatura de specialitate ce investighează cicatrizarea patologică din prisma alterărilor genetice somatice este în stadiu incipient, prezentând un număr limitat de Genome Wide Association Studies (GWAS) și o serie de asocieri punctuale polimorfism-patologie, efectuate pe loturi restrânse de pacienți.

Lucrarea de față vine în completarea acestor informații, prin studierea fenomenelor de remaniere cicatricială la nivelul unui grup de paciente care au fost supuse intervenției de secțiune cezariană.

Cuvinte-cheie: cicatrizare, cicatrice atrofică, cicatrice hipertrofica, hTERT, COL5A2, TGF- $\beta$ 1, GSTT1, GSTM1, VDR

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### Studiu 1. Impactul variantelor polimorfice a COL5A2 și TGF- $\beta$ 1 în cicatrizarea patologică

Introducere. Dereglarea procesului de vindecare a plăgilor cutanate este o consecință a modificărilor eficienței și activității diferitelor componente implicate în procesul de vindecare. Această dereglare poate duce la diverse aspecte clinice ale leziunii, cum ar fi ulcerele cutanate, cheloizii, cicatricile hipertrofice și atrofice. Gena colagenului tip V alfa 2 (COL5A2) oferă un șablon pentru o componentă a colagenului tip V, găsită în principal în membrana bazală a pielii. Factorul de transformare al creșterii (TGF)- $\beta$  este implicat în inflamație, angiogeneză, proliferarea fibroblastelor, sinteza de colagen și remodelarea matricei extracelulare. Fibroblastele cicatricilor hipertrofice au un model de expresie perturbat al semnalizării TGF- $\beta$  în comparație cu vindecarea normală, în timp ce semnalizarea crescută a TGF- $\beta$  reduce rata de proliferare epidermică, declanșând cicatricile atrofice.

Metode. În prezentul studiu, au fost examinate 71 de paciente care au suferit o secțiune cezariană planificată, fără complicații postoperatorii. Aceste paciente au fost evaluate clinic și molecular după dezvoltarea cicatricilor pentru a determina rolul TGF- $\beta$ 1 (rs201700967 și rs200230083) și COL5A2 (rs369072636) în cicatrizarea patologică. Evaluarea clinică a cicatricilor a fost realizată folosind scalele SCAR și POSAS, iar genotiparea a fost efectuată prin RT-PCR.

Rezultate, concluzii. Nu au fost relevate diferențe statistice între subgrupuri cu privire la genotip și cicatrizare patologică, deoarece toți pacienții incluși au fost purtători alelei wild-type. Investigații suplimentare și un grup de studiu mai

reprezentativ pot evidenția implicarea variantelor nucleotidice unice COL5A2 și TGF- $\beta$ 1 în cicatrizarea patologică.

## **Studiu 2. Impactul alelelor nule GSTT1/GSTM1 în cicatrizarea patologică**

**Introducere.** Procesul de cicatrizare reprezintă un punct comun de interes pentru domeniul medical. De la medicina generală la stomatologie, țesutul cicatricial patologic reprezintă o provocare în îngrijirea optimă a pacientului. Prezentul studiu își propune să investigheze dacă o capacitate antioxidantă redusă sistemic, din prisma izoformelor nule ale glutathion-S-transferazei, afectează procesul de cicatrizare la un grup de pacienți.

**Metode.** Studiul se bazează pe un grup de 54 de pacienți cu cicatrici fiziologice după un interval de observație de 6 luni, precum și 18 pacienți cu cicatrici hipertrofice sau atrofice. S-a colectat sânge venos periferic, din care s-a extras ADN folosind un kit comercial. Genotiparea a urmat un protocol PCR Multiplex pentru GSTT1/GSTM1.

**Rezultate.** Într-un model dominant, combinația de GSTT1 și GSTM1 wild type (heterozigot sau homozigot) a fost asociată negativ cu cicatrizarea patologică, genotipul GSTM1 wild type (heterozigot sau homozigot) fiind potențial responsabil pentru acest efect. Alți factori care afectează cicatrizarea patologică au fost investigați: istoricul familial, fototipul, precum și scorurile pe scală POSAS și SCAR.

**Concluzii.** Prezența alelelor GSTT1 și GSTM1 aduce în prim-plan o capacitate antioxidantă crescută, servind ca factor de protecție pentru pacienți în timpul formării cicatricilor.

## **Studiu 3. Impactul polimorfismului rs2228570 al VDR în cicatrizarea patologică**

**Introducere.** Procesul fiziologic al cicatrizării este un punct comun de interes într-o gamă largă de specialități medicale. Baza moleculară prin care acest proces duce la cicatrizare patologică la unele persoane este slab înțeleasă în prezent, existând indicii care indică o predispoziție individuală pentru cicatrizare patologică. Vitamina D joacă un rol cheie în metabolismul și homeostazia pielii, cu modificări ale nivelului receptorului de vitamina D (VDR) observate în cicatricile patologice.

**Metode.** Prezentul studiu a investigat rolul polimorfismului rs2228570 al VDR în ceea ce privește formarea și evoluția cicatricilor într-un grup de 71 de pacienți care se recuperau după o operație de cezariană. S-au prelevat probe de sânge în momentul



operației, iar urmărirea a fost realizată la distanță la 3 și 6 luni după operație. Polimorfismul rs2228570 a fost investigat utilizând un protocol RFLP-PCR.

Rezultate, concluzii. Rezultatele au demonstrat că genotipul CC, în combinație cu Scalele de Evaluare a Cicatricilor de către Pacient (POSAS) și SCAR sunt asociate cu cicatrizarea patologică, fiind necesare mai multe studii pentru a trage o concluzie fermă.

#### **Studiul 4. Impactul polimorfismului rs2736100 al hTERT în cicatrizarea patologică**

Introducere. Cicatricile hipertrofice și atrofice sunt efectul unui proces de vindecare a rănilor dereglat la indivizii predispuși genetic. Predispoziția genetică a atras atenție semnificativă datorită fenotipului divers al cicatricilor patologice la indivizii cu istoric personal și familial pozitiv. Studiile recente au identificat scurtarea telomerelor și activitatea hTERT scăzută în cicatricile patologice, propunând varianta rs2736100 a genei de transcripție inversă a telomerazei umane (hTERT) ca un candidat pentru studiu.

Metode. Am examinat procesul de cicatrizare la 71 de pacienti femei care au suferit o secțiune cezariană și au dezvoltat cicatrici hipertrofice și atrofice, cu obiectivul de a investiga rolul polimorfismului cu un singur nucleotid (SNP) rs2736100 în cicatrizarea patologică. Genotiparea a fost efectuată utilizând RT-PCR, iar urmărirea a inclus Scala de evaluare a cicatricilor observate de pacient (POSAS) și scalele SCAR.

Rezultate. Analiza comparativă a valorii medii POSAS între controalele la 3 și 6 luni a arătat o diferență scăzută statistic de 1,71 puncte [interval de încredere (CI) de 95%, 0,4-2,89;  $P = 0,01$ ], în timp ce SCAR a evidențiat o diferență scăzută de 0,670 (95% CI, -0,04-1,38;  $P = 0,055$ ). Alela variantă C a prezentat o valoare statistic borderline pentru risc de dezvoltare a cicatrizării patologice (OR = 1,44; 95% CI, 0,876-1,332;  $P = 0,066$ ). În studiul nostru, un indice de masă corporală preconcepțional (IMC)  $>25$  kg/m<sup>2</sup> a fost asociat statistic cu cicatrizarea patologică. Fototipul Fitzpatrick tipul 4 a prezentat o frecvență crescută pentru genotipul heterozigot în studiul actual, iar a fost demonstrat că tonul pielii întunecat este asociat cu formarea anormală a cicatricilor.

Concluzii. Studiul nostru a investigat rolul genei hTERT variant rs2736100 în cicatrizarea hipertrofică și atrofică într-un grup de populație caucazian. Raportăm o valoare borderline statistic semnificativă pentru alela C a SNP hTERT pentru risc de dezvoltare a cicatrizării patologice la pacientele femei care au suferit o operație de cezariană.

## Concluzii generale

Variantele polimorfice ale genelor COL5A2 și TGF- $\beta$ 1 nu au fost identificate în stare heterozigotă sau homozigot-mutantă în cadrul studiului de față.

Studiul 2 sugerează potențiala implicare a genotipurilor wild-type GSTT1 și GSTM1 wild-type (în formă homozigotă sau heterozigotă) în cicatrizarea fiziologică. Fototipul Fitzpatrick de tip 4 pare să beneficieze într-o mai mare măsură de acest efect protectiv.

În cazul polimorfismului receptorului vitaminei D (VDR), genotipul wild-type a demonstrat o potențială corelație cu scăderea valorilor obținute în urma testelor SCAR și POSAS, indicând o cicatrizare patologică. Genotipul heterozigot în asociere cu scorul SCAR, poate fi considerat predictor al cicatrizării patologice.

Alela C a variantei rs2736100 a genei hTERT este asociată cu cicatrizarea patologică atrofică sau hipertrofică în grupul de studiu investigat.

Un indice de masă corporal preconcepțional de peste 25 kg/m<sup>2</sup> este un factor predictiv pentru cicatrizarea patologică, iar un câștig ponderal de peste 12 kg în decursul sarcinii pare să fie asociat cu dezvoltarea cicatricilor patologice.

Rezultatele obținute sunt limitate major din prisma lotului restrâns de studiu: extinderea genotipurilor ar putea întări asocierile prezentate, precum și releva alte corelații care nu au atins semnificație statistică pe lotul de studiu curent.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

La momentul publicării, prezenta teză de doctorat raportează primele studii privitoare la influența mutațiilor de linie somatică asupra procesului cicatrizării în cazul populației de sex feminin din România.

Metodologia folosită pentru colectarea datelor reprezintă altă particularitate a studiilor de față: astfel, această teză poate servi ca șablon primar, de completat și extins, pentru alte studii viitoare asupra mutațiilor somatice în cadrul procesului de cicatrizare, pentru a îndeplini ceea ce nu poate fi un obiectiv al unei teze de doctorat, ci un deziderat global, posibil de obținut doar prin colaborare susținută între specialități, instituții și țări diferite: stabilirea unui panel de mutații asociate cu un risc crescut de dezvoltare a cicatricilor patologice și folosirea acestuia în practica clinică.

Protocolele de lucru folosite sunt descrise exhaustiv și precis, în vederea reproducerii metodei. Adicional, aceste instrucțiuni pot deveni suport pentru alți cercetători în căutarea de a obține claritate adițională pe lângă protocoalele oferite de producător, care sunt redactate cu anumite intervale de permisiune a parametrilor folosiți.

Pe lângă investigarea unor variante polimorfice studiate în contextul altor patologii din rândul populației României, studiul 1 al lucrării de față aduce primele date

---

referitoare la frecvența populațională a 3 variante polimorfice rare: polimorfismul rs369072636 al COL5A2 și polimorfismele rs201700967, respectiv rs200230083 al TGF- $\beta$ 1.

Lucrarea de față conturează primele linii de orientare cu privire la studiul geneticii cicatricilor patologice des întâlnite, de natură hipertrofică sau atrofică.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Genetic aspects of scar remodeling

---

PhD Student: **Roxana Flavia Ilieș**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Ioan Victor Pop**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>GENERAL ASPECTS</b>	
<b>1. Physiological scarring</b>	<b>19</b>
<b>2. Pathological scarring</b>	<b>21</b>
2.1 Clinical aspects of pathological scarring	21
2.1.1 Atrophic scars	21
2.1.2 Hypertrophic scars	21
2.1.3 Keloid scars	22
<b>3. Genetic factors involved in scarring</b>	<b>25</b>
3.1 Justifying the study of genetic factors in scarring	25
3.2 Growth factor genetics	26
3.3 Scar angiogenesis genetics	27
3.4 Apoptosis	28
3.5 Potential targets in the study of genetic factors of scarring	28
<b>4. Therapeutic options in pathological scarring</b>	<b>29</b>
4.1 Assessment and treatment plan	29
4.2 Pharmacotherapy of scars	29
4.3 Other therapeutic options in scar management	30
4.4 Upcoming therapies	30
<b>5. Impact of pathological scarring on quality of life</b>	<b>33</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Hypothesis, objectives</b>	<b>37</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>39</b>
<b>3. 1st study. Involvement of COL5A2 and TGF- <math>\beta</math>1 in pathological scarring</b>	<b>49</b>
3.1 Introduction	49

3.2 Materials and methods	50
3.2.1 Genotyping	50
3.2.2 Statistical analysis	53
3.3 Results	54
3.3.1 Demographic, clinical data	54
3.3.2 Analysis of rs369072636 (COL5A2)	62
3.3.3 Analysis of rs201700967 and rs200230083 (TGF- $\beta$ 1)	62
3.4 Discussions	62
3.5 Conclusions	68
<b>4. 2nd study. The influence of GSTT/GSTM null genotypes in scarring</b>	71
4.1 Introduction	71
4.2. Materials and methods	71
4.2.1 Genotyping	72
4.2.2 Statistical analysis	73
4.3 Results	73
4.3.1 Demographic, clinical data	73
4.3.2 Analysis of GSTT1/GSTM1 null alleles	75
4.3.3 Analysis of GSTT1/GSTM1 null alleles correlated with clinical parameters	76
4.4 Discussions	76
4.5 Conclusions	79
<b>5. 3rd study. Influence of vitamin D receptor polymorphism rs2228570 on pathological scarring</b>	81
5.1 Introduction	81
5.2 Materials and methods	82
5.2.1 Genotyping	82
5.2.2 Statistical analysis	83
5.3 Results	84
5.3.1 Analysis of polymorphic variant of VDR	84
5.3.2 Analysis of polymorphic variant of VDR correlated with clinical parameters	84
5.4 Discussions	85
5.5 Conclusions	89

---

<b>6. 4th study. Role of hTERT rs2736100 in pathological scarring</b>	91
6.1 Introduction	91
6.2 Materials and methods	92
6.2.1 Genotyping	92
6.2.2 Statistical analysis	93
6.3 Results	94
6.3.1 Analysis of rs2736100	94
6.3.2 Analysis of rs2736100 correlated with clinical parameters	94
6.4 Discussions	95
6.5 Conclusions	98
<b>7. General discussions</b>	99
<b>8. General conclusions</b>	103
<b>9. Originality and contributions of the present thesis</b>	105
<b>REFERENCES</b>	107

## INTRODUCTION

Healing is a component of the physiological process of repairing the skin following an injury and is a phenomenon experienced by most people at some point in their lives. Physiological healing culminates in the appearance of a fine, pearly white scar that is supple, has minimal aesthetic impact, and has no functional impact.

In the remodeling stage, the physiological result of healing is based on a fragile balance between the formation of the necessary healing components and their breakdown. Several variables, starting with mechanical aspects (position and tension at the site of the injured tissue) and leading to intrinsic aspects (the tendency of some patients to synthesize excessive collagen), can alter this balance, resulting in pathological scars.

The spectrum of pathological scarring includes atrophic scars, marked by fragile newly formed skin with significant aesthetic impact, as well as hypertrophic and keloid scars, which are at the opposite end of the spectrum, represented by excessive scar tissue. This can have both significant aesthetic and functional consequences, from local discomfort to joint stiffness caused by the limitation of movements in the affected area. The most severe form of pathological scarring is keloid scarring, where the proliferation of scar tissue exceeds the initial limits of the injury.

The incidence of this type of scarring is higher among African American patients, showing a notable familial aggregation. Furthermore, at the molecular level, keloid scars behave similarly to a benign tumor formation. The healing process is a long-term one, with the first opportunity to evaluate the result of healing being at six months from the time of the skin injury.

During the analysis process of healing carried out on the patient cohort included in this research, it was observed that some scars tended to present pathological aspects within a 3-month observation interval, with normalization of the scar at the final 6-month observation. Conversely, some of the pathological scars subjected to analysis underwent a seemingly physiological healing process at a 3-month interval. For this reason, conventionally, therapy for pathological scars is initiated after their maturation and subsequent diagnosis of the scar.

Therapeutic approaches involve local injections with corticosteroids, laser procedures, or surgical reintervention. The therapeutic process is lengthy, expensive, and with a relatively low success rate. The aforementioned aspects justify the investigation of pathological scars from the perspective of the patient's genetic background. Defining the genetic portrait of the patient predisposed to pathological scarring allows for primary prevention of pathological scarring, as well as preoperative planning of the incision, taking into account the maintenance of low mechanical tension



at the incision site. The specialized literature investigating pathological scarring from the perspective of somatic genetic alterations is in its infancy, with a limited number of Genome Wide Association Studies (GWAS) and a series of polymorphism-pathology associations performed on small patient cohorts.

This work complements this information by studying the phenomenon of scar remodeling at the level of a group of patients who underwent cesarean section surgery. Keywords: healing, atrophic scar, hypertrophic scar, hTERT, COL5A2, TGF- $\beta$ 1, GSTT1, GSTM1, VDR.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### **1st study. Involvement of COL5A2 and TGF- $\beta$ 1 in pathological scarring**

**Introduction.** Dysregulation in the cutaneous wound-healing process is a consequence of alterations in the efficiency and activity of the various components involved in the healing process. This dysregulation may result in various clinical appearances of a lesion, such as skin ulcers, keloids, hypertrophic and atrophic scars. The collagen type V alpha 2 (*COL5A2*) gene provides a template for a component of type V collagen, found primarily within the skin basement membrane. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  is involved in inflammation, angiogenesis, proliferation of fibroblasts, collagen synthesis and extracellular matrix remodeling. Hypertrophic scar fibroblasts possess a disrupted expression pattern of the TGF- $\beta$  signaling compared to normal healing, while an increased TGF- $\beta$  signaling reduces the epidermal proliferation rate, triggering atrophic scarring.

**Methods.** In the present study, 71 female patients who had undergone planned Caesarean section, without postoperative complications, were examined. These patients were clinically and molecularly evaluated after developing scars in order to determine the role of TGF- $\beta$ 1 (rs201700967 and rs200230083) and COL5A2 (rs369072636) in pathological scarring. Clinical scar evaluation was carried out using SCAR and POSAS scales and genotyping was performed by RT-PCR.

**Results, conclusions.** No statistical differences were found between the subgroups regarding the genotype and the pathological scarring, since all the patients included were wild-type allele carriers. Further investigations and a more representative study group may highlight the involvement of COL5A2 and TGF- $\beta$ 1 single nucleotide variants in pathological scarring.

## **2nd study. The influence of GSTT/GSTM null genotypes in scarring**

**Introduction.** The process of scarring is a common denominator of interest for the medical field. From general medicine to dentistry, pathological scar tissue represents a challenge in providing optimal care to a patient. The present study aims to investigate whether a systemically reduced antioxidant potential, revealed by null isoforms of glutathione S transferase, affects the process of scarring in a group of female patients.

**Methods.** The study is based on a group of 54 patients with physiological scars after a 6-month observation period, as well as 18 patients with hypertrophic or atrophic scars. Peripheral venous blood was collected, from which DNA was extracted using a commercial kit. Genotyping followed a Multiplex PCR protocol for GSTT1/GSTM1.

**Results.** In a dominant model, the combination of wild type (heterozygous or homozygous) GSTT1 and GSTM1 was negatively associated with pathological scarring, with the wild type (heterozygous or homozygous) GSTM1 genotype being potentially responsible for this effect. Other factors affecting pathological scarring were investigated: family history, phototype, as well as scores on the POSAS and SCAR scales.

**Conclusions.** The presence of GSTT1 and GSTM1 alleles brings forward an increased antioxidant capacity, serving as a protective factor for patients during scar formation.

## **3rd study. Influence of vitamin D receptor polymorphism rs2228570 on pathological scarring**

**Introduction.** The physiological process of scarring is a common denominator of interest in a plethora of medical specialties. The molecular basis whereby this process results in pathological scarring for some individuals is poorly understood at present, with clues pointing towards individual predisposition for pathological scarring. Vitamin D and its subsequent pathway plays a key role in skin metabolism and homeostasis, with alterations in the level of vitamin D receptor (VDR) seen within pathological scars.

**Methods.** The present study investigated the role of the rs2228570 polymorphism of *VDR* with regards to scar formation and evolution in a group of 71 female patients recovering from Caesarian section. Blood samples were taken at the

time of surgery, and the follow-up was collected remotely at 3 and 6 months after surgery. The rs2228570 polymorphism was investigated using an RFLP-PCR protocol.

Results, conclusions. The results demonstrated that the CC genotype, in combination with the Patient Observer Scar Assessment Scale (POSAS) and SCAR scores are associated with pathological scarring, with more studies being necessary to draw a firm conclusion.

#### **4th study. Role of hTERT rs2736100 in pathological scarring**

Introduction. Hypertrophic and atrophic scars are the effect of a dysregulated wound-healing process in genetically predisposed individuals. The genetic predisposition has acquired significant attention due to the diverse phenotype of pathological scarring in individuals with a positive personal and family history. Recent studies have identified telomere shortening and decreased hTERT activity in pathological scarring, proposing the rs2736100 variant of human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene as a valuable variant gene candidate.

Methods. We examined the scarring process in 71 female patients who had undergone Caesarean section and developed hypertrophic and atrophic scars with the objective to investigate the role of single nucleotide polymorphism (SNP) rs2736100 in pathological scarring. Genotyping was performed using RT-PCR and follow-up included the Patient Observer Scar Assessment Scale (POSAS) and SCAR scales.

Results. Comparative analysis for mean POSAS value between the check-ups at 3 and 6 months revealed a statistically decreased difference of 1.71 points [95% confidence interval (CI), 0.4-2.89;  $P=0.01$ ], while SCAR highlighted a decreased difference of 0.670 (95% CI, -0.04-1.38;  $P=0.055$ ). The C variant allele revealed a borderline statistical value for the risk of developing pathological scarring (OR=1.44; 95% CI, 0.876-1.332;  $P=0.066$ ). In our study a pre-conceptual body mass index (BMI)  $>25 \text{ kg/m}^2$  was statistically associated with pathological scarring. The Fitzpatrick type 4 phototype displayed an increased frequency for the heterozygous genotype in the current study, and it was demonstrated that dark skin tone was associated with abnormal scar formation.

Conclusions. Our study investigated the role of *hTERT* gene variant rs2736100 in hypertrophic and atrophic scarring in a Caucasian population group. We report a borderline statistically significant value for the variant C allele of *hTERT* SNP for the risk of developing pathological scarring in female patients that had undergone Caesarean section.

## General conclusions

The polymorphic variants of the COL5A2 and TGF- $\beta$ 1 genes were not identified in heterozygous or homozygous mutant state in this study. Study 2 suggests the potential involvement of wild-type GSTT1 and GSTM1 (in homozygous or heterozygous form) genotypes in physiological healing. Fitzpatrick skin type 4 appears to benefit more from this protective effect. In the case of the vitamin D receptor (VDR) polymorphism, the wild-type genotype demonstrated a potential correlation with decreased values obtained from the SCAR and POSAS tests, indicating pathological scarring.

The heterozygous genotype in association with the SCAR score may be considered a predictor of pathological scarring. The C allele of the rs2736100 variant of the hTERT gene is associated with atrophic or hypertrophic pathological scarring in the investigated study group. A preconception body mass index over 25 kg/m<sup>2</sup> is a predictive factor for pathological scarring, and a weight gain of over 12 kg during pregnancy appears to be associated with the development of pathological scars. The results obtained are limited mainly by the small study population: expanding the genotyping could strengthen the presented associations, as well as reveal other correlations that did not reach statistical significance in the current study population.

## Originality and contributions of the present thesis

At the time of publication, this doctoral thesis reports the first studies regarding the influence of somatic mutations on the scarring process in the female population of Romania. The methodology used for data collection represents another particularity of the present studies: thus, this thesis can serve as a primary template to be completed and expanded for future studies on somatic mutations within the scarring process, in order to achieve what cannot be an objective of a doctoral thesis but a global goal, achievable only through sustained collaboration between different specialties, institutions, and countries: the establishment of a panel of mutations associated with an increased risk of developing pathological scars and its use in clinical practice.

The working protocols used are fully and precisely described, for the sake of method reproducibility. Additionally, these instructions can become support for other researchers seeking additional clarity in addition to the protocols provided by the manufacturer, which are drafted with certain intervals of parameter permission used.

In addition to investigating some polymorphic variants studied in the context of other pathologies among the population of Romania, the first study of this thesis brings the

first data regarding the population frequency of 3 rare polymorphic variants: the rs369072636 polymorphism of COL5A2 and the rs201700967 and rs200230083 polymorphisms of TGF- $\beta$ 1.

This thesis outlines the first lines of orientation regarding the study of the genetics of frequently encountered pathological scars, of hypertrophic or atrophic nature. The study design, as well as the difficulties encountered during its implementation, can support other researchers in developing more complex, complete, and statistically consolidated experiments.