

УДК 616-001.5-002.3:616-092

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА $TGF\beta_1$ -25ARG>PRO НА ЭКСПРЕССИЮ РОСТОВОГО ФАКТОРА $TGF\beta_1$ У БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЕМ КОНСОЛИДАЦИИ ПЕРЕЛОМОВ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

Миromanov A.M., Gusev K.A., Miromanova N.A.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Чита, e-mail: kafravm-chita@mail.ru

Представлены результаты исследования влияния полиморфного маркера гена трансформирующего ростового фактора бета 1 в позиции -25Arg>Pro на экспрессию кодируемого ростового фактора $TGF\beta_1$ у больных с нарушением консолидации переломов костей конечностей в Забайкальском крае. Первую группу составили 62 пациента с неосложненным течением переломов (группа клинического сравнения). Вторую группу (n = 46) – больные с нарушением консолидации переломов (в раннем послеоперационном периоде осложнений не зарегистрировано, однако в позднем периоде зафиксировано развитие нарушения консолидации по типу замедленной консолидации). Контрольную группу составили 100 практически здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет. Сформированные группы являлись однородными по возрасту, полу, характеру и локализации переломов и проводимому лечению. Критерием исключения из групп являлось наличие острых или хронических сопутствующих заболеваний. Установлено, что у больных с нарушением консолидации переломов регистрируется более высокое носительство генотипа – 25Pro/Pro гена $TGF\beta_1$. Наличие генотипа -25Pro/Pro полиморфизма гена $TGF\beta_1$ способствует значимому снижению экспрессии ростового фактора $TGF\beta_1$.

Ключевые слова: полиморфизм, цитокины, переломы, нарушение консолидации

INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF GENE $TGF\beta_1$ -25ARG>PRO ON EXPRESSION TRANSFORMING GROWTH FACTOR $TGF\beta_1$ AT PATIENTS WITH DISTURBANCE OF CONSOLIDATION OF FRACTURES IN ZABAİKALIAN EDGE

Miromanov A.M., Gusev K.A., Miromanova N.A.

Chita State Medical Academy, Chita, e-mail: kafravm-chita@mail.ru

Results of research of influence of a polymorphic marker of transforming growth factor beta 1 gene are presented to positions -25Arg>Pro on an expression coded transforming growth factor beta 1 at patients with disturbance of consolidation of fractures of bones of extremities in Zabaikalian edge. The first group was made by 62 patients with an uncomplicated current of fractures (group of clinical comparison). The second group (n = 46) patients with disturbance of consolidation of fractures (in the early postoperative period of complications it is not registered, however in the late period is fixed development of disturbance of consolidation as the slowed down consolidation). The control group was made by practically healthy 100 donors at the age from 20 till 40 years. The generated groups were homogeneous for an age, gender, character and localisation of fractures and spent treatment. Criterion of an exception of groups was presence of acute or chronic accompanying diseases. It is established, that at patients with disturbance of consolidation of fractures higher carriage of a genotype -25Pro/Pro gene $TGF\beta_1$ is registered. Genotype presence -25Pro/Pro polymorphism of gene $TGF\beta_1$ promotes significant depression of an expression transforming growth factor beta 1.

Keywords: polymorphism, cytokines, fractures, delayed consolidation

Актуальность изучения патогенеза нарушений консолидации при переломах костей конечностей определяется значительной частотой возникновения данных осложнений, трудностью их лечения и высоким уровнем инвалидности [6].

Доказано, что к одним из основных факторов, определяющих особенности исхода при переломах, относится иммунная система, нарушение которой может приводить к развитию различных осложнений, в том числе и нарушений консолидации [4]. Иммунные клетки секретируют многочисленные медиаторы (цитокины), играющие ключевую роль в репаративных процессах [2]. Одним из таких медиаторов является трансформирующий фактор роста бета 1 ($TGF\beta_1$). $TGF\beta_1$ – мультипотентный цитокин, являю-

щийся важным модулятором клеточного роста, воспаления, пролиферации и дифференцировки, внеклеточного матричного депонирования и апоптоза [11]. $TGF\beta_1$ активирован и способствует процессам репарации ран и непосредственно стимулирует ангиогенез [3]. Согласно исследованиям последних лет, важная роль в развитии осложнений отводится наследственным факторам. Генетически запрограммированный повышенный или пониженный синтез цитокинов является существенным в предрасположенности к развитию осложнений или заболеваний [1]. Ген $TGF\beta_1$ – высокополиморфный участок генома, в котором описано более десяти полиморфных сайтов. Установлено, что некоторые из полиморфизмов оказывают влияние на уровень

продукции $TGF\beta_1$ in vitro [14]. Многие исследования показали ассоциацию отдельных полиморфизмов гена $TGF\beta_1$, не только с пониженной [13] или повышенной костной массой [12], но и с различными заболеваниями [7, 10].

Поскольку в нашей стране и за рубежом молекулярно-генетическим исследованиям больных травматолого-ортопедического профиля не уделено должного внимания, изучение генетического полиморфизма цитокинов, принимающих участие в механизмах регуляции межклеточных взаимодействий у больных при травме, а также поиски генетических маркеров развития осложнений представляются актуальными как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Цель исследования – изучить влияние полиморфизма гена $TGF\beta_1-25Arg>Pro$ на экспрессию $TGF\beta_1$ у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае.

Материалы и методы исследования

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2011 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Проведено обследование 108 пациентов в возрасте от 20 до 40 лет с переломами длинных костей конечностей, лечившихся в травматологических стационарах г. Читы. Первую группу составили 62 пациента с неосложнённым течением переломов (группа клинического сравнения), вторую группу – 46 больных с осложнённым течением (в позднем послеоперационном периоде зарегистрировано нарушение консолидации переломов по типу замедленной консолидации). Контрольную группу составили 100 практически здоровых мужчин и женщин в возрасте от 20 до 40 лет.

Всем пациентам с закрытыми переломами проводилась открытая репозиция отломков с последующим металлоостеосинтезом пластинами или штифтами. Больным с открытыми переломами при поступлении

выполнялась первичная хирургическая обработка и наложение аппаратов наружной фиксации. В дальнейшем применялась традиционная консервативная терапия (антибактериальные средства, дезагреганты, местное медикаментозное лечение и др.). Сформированные группы являлись относительно однородными как по возрасту, полу, характеру и локализации переломов, так и по проводимому лечению. Критерием исключения из групп являлось наличие острых или хронических сопутствующих заболеваний.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. Для исследования выбрана точечная мутация $TGF\beta_1$ в позиции 25 ($Arg>Pro$). Амплификацию фрагмента исследуемого гена проводили в термоцикле (модель Ре «Бис» – M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-«SNP» (Москва). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете [9]. Определение концентрации цитокина $TGF\beta_1$ осуществляли с помощью набора реагентов ООО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Забор материала (венозная кровь) для лабораторного исследования осуществлялся на 10 сутки после травмы. Сроки наблюдения за больными составили: при поступлении в стационар (1 сутки после травмы), 10 сутки после оперативного лечения, в дальнейшем через 3 месяца.

Полученные данные обработаны с помощью пакета программ «STATISTICA 6.1» (Stat Soft, USA), «Microsoft Office Exell 2010 for Windows 7», «БИО-СТАТ». Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (M), стандартные отклонения (SD). Для сравнения показателей пациентов с осложнённым и неосложнённым течением переломов длинных костей конечностей использовали критерий Манна-Уитни. Для анализа групп по качественному бинарному признаку применялся критерий χ^2 . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Первым этапом нами выявлена частота распределения аллелей и генотипов полиморфного гена $TGF\beta_1-25Arg>Pro$ в исследуемых группах (табл. 1) [8].

Таблица 1

Частота генотипов гена $TGF\beta_1-25Arg>Pro$ и его аллельных вариантов среди здоровых резидентов и пациентов с переломами костей конечностей (χ^2 , df = 1)

	Контроль, n = 100	Неосложненное течение, n = 62	Замедленная консолидация, n = 46
Аллель Arg	0,74	0,77	0,38*/**
Аллель Pro	0,26	0,23	0,62*/**
Генотип ArgArg	0,6	0,58	0,28*/**
Генотип ArgPro	0,28	0,37	0,2*/**
Генотип ProPro	0,12	0,05	0,52*/**

Примечание. * – статистическая значимость различий с контролем; ** – статистическая значимость различий между I и II группой.

В группе с нарушением консолидации на долю гомозиготного генотипа -25Arg/Arg гена $TGF\beta_1$ приходилось 28,26%, тогда как в группе с неосложнённым течением – 58,1%. Генотип -25Arg/Pro гена $TGF\beta_1$ встречался в 19,57% у пациентов второй группы против 37,1% в первой. В группе с развитием замедленной консолидации выявлено 24 (52,17%) пациента с гомозиготной мутацией, тогда как в группе клинического сравнения только 3 (4,8%). Частота аллеля -27Arg- гена $TGF\beta_1$ у больных группы с неосложнённым течением переломов составила 0,77, аллеля -27Pro- – 0,23, а в группе с нарушением консолидации – 0,38 и 0,62 соответственно ($p = 0,0001$). В группе контроля носительство генотипов и его аллельных вариантов не отличалось от аналогичных параметров группы клинического сравнения (табл. 1) [8].

Прежде чем определить влияние генотипов исследуемого полиморфизма гена $TGF\beta_1$ на экспрессию $TGF\beta_1$, нами проведено изучение общего содержания ростового фактора $TGF\beta_1$ на 10-е сутки после травмы (табл. 2).

Таблица 2

Содержание $TGF\beta_1$ у больных с неосложнённым течением переломов длинных костей конечностей и нарушением консолидации на 10-е сутки после травмы, пг/мл ($M \pm SD$)

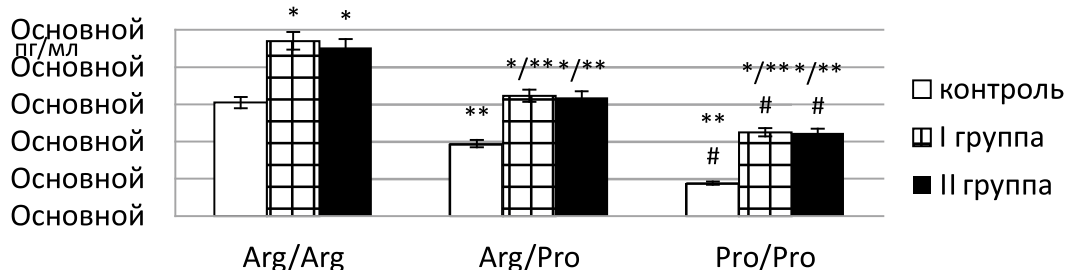
	Контроль (n = 100)	I группа (n = 62)	II группа (n = 46)
$TGF\beta_1$	$74,37 \pm 28,8$	$121,2 \pm 30,4$ $p = 0,0001$	$92,07 \pm 31,2$ $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0001$

Примечание. p – статистическая значимость различий с контролем; p_1 – статистическая значимость различий с группой клинического сравнения.

Количественные показатели $TGF\beta_1$ у пациентов с неосложнённым течением и нарушением консолидации превышали аналогичные значения в контрольной группе в 1,6 и 1,2 раза соответственно, что является закономерным и говорит о сохранении воспалительного ответа в зоне повреждения вследствие продолжающихся регенераторных процессов в костной ткани [4]. Однако у больных с нарушением консолидации регистрировалось снижение данного параметра в 1,3 раза по сопоставлению с группой клинического сравнения, что подтверждает ведущую роль исследуемых белков в процессах регенерации тканей и свидетельствует о нарушении консолидации перелома [4].

Третьим этапом работы мы установили влияние генотипов полиморфизма гена $TGF\beta_1$ -25Arg>Pro на уровень продукции кодируемого цитокина (рисунок).

В группе с неосложнённым течением переломов у обладателей генотипа -25Arg/Arg гена $TGF\beta_1$ содержание $TGF\beta_1$ на 10 сутки посттравматического периода регистрируется на цифрах – $141,2 \pm 20,12$ пг/мл, что в 1,5 раза выше, по сравнению с группой контроля ($p < 0,0001$). У носителей гетерозиготного варианта -25Arg/Pro уровень $TGF\beta_1$ снижался относительно генотипа -25Arg/Arg в 1,5 раза и превышал аналогичное значение группы контроля в 1,7 раза. Что касается носительства мутантных гомозиготных вариантов в данной группе, то выявлено, что генотип -25Pro/Pro регистрировался в трех случаях, причем концентрация кодируемого белка находилась ниже уровня генотипа -25Arg/Arg и -25Arg/Pro в 2,1 и 1,4 раза соответственно, $p < 0,0001$. Аналогичная картина синтеза ростового фактора $TGF\beta_1$ при гомозиготной мутации зафиксирована как в группе пациентов с развитием замедленной консолидации переломов, так и в группе практически здоровых лиц (рисунок).



Содержание $TGF\beta_1$ на 10-е сутки в крови у травмированных больных в зависимости от генотипа полиморфизма гена $TGF\beta_1$ -25Arg>Pro. Примечание: * – статистическая значимость различий с контролем; ** – статистическая значимость различий с нормальной гомозиготой; # – статистическая значимость различий с гетерозиготой (достоверно при $p < 0,05$)

Таким образом, полученные данные показывают, что наличие генотипа *-25Pro/Pro* полиморфизма гена *TGFβ₁-25Arg>Pro* способствует значимому снижению экспрессии цитокина *TGFβ₁* при переломах длинных костей конечностей, что в свою очередь приводит к дисбалансу процессов ремоделирования костной ткани и нарушению консолидации переломов [4, 15]. Однако, исходя из данных о роли *TGFβ₁*, можно предположить, что в зависимости от совокупности других факторов, неблагоприятным может оказаться как низкий, так и высокий уровень *TGFβ₁*, и соответственно носительство альтернативных аллелей полиморфных участков гена, влияющих на уровень продукции белка [5].

Функциональная значимость полиморфизма гена *TGFβ₁* в работах разных исследователей неоднозначна, что, по-видимому, обусловлено природой патогенеза заболевания, особенностями клеточных линий, стимуляторов и другими условиями эксперимента [5].

У пациентов с нарушением консолидации переломов наиболее часто встречается гомозиготный генотип мутаций (*-25Pro/Pro*), что повышает вероятность развития нарушения регенераторных процессов при переломах. Данный факт указывает на важный вклад аллельного полиморфизма генов цитокинов в индивидуальные различия больных по характеру течения репаративной регенерации [8] вследствие разной экспрессии кодируемого цитокина [5]. В рамках рассматриваемой проблемы идентификация генов, вовлеченных в патогенез нарушения консолидации, является важной задачей, решение которой способствует формированию фундаментальных представлений о патогенезе данного социально значимого осложнения, что в конечном итоге позволит сделать долгосрочный индивидуальный прогноз для конкретного лица и провести необходимые профилактические мероприятия для его предотвращения.

Выводы

1. У больных с нарушением консолидации переломов регистрируется более высокое носительство генотипа *-25Pro/Pro* гена *TGFβ₁*.

2. Наличие генотипа *-25Pro/Pro* полиморфизма гена *TGFβ₁* у больных с переломами длинных костей конечностей способствует более низкой экспрессии ростового фактора *TGFβ₁*.

Список литературы

1. Генетический полиморфизм цитокинов / Цыган В.Н [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2010. – № 2. – С. 211–219.

2. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.

3. Маленькая молекула и большая болезнь / А.С. Рудой и [др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2009. – № 3(27). – С. 166–172.

4. Миromanov А.М. Прогностические критерии развития осложнений при переломах костей конечностей / А.М. Миromanov, Е.В. Намоконов. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2014. – 175 с.

5. Оценка значимости полиморфизмов генов LRP5, BMP4, TGFβ1 при постменопаузальном остеопорозе / В.А. Мякоткин [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2008. – № 3. – С. 8–15.

6. Павлов Д.В. Интрамедуллярный остеосинтез при лечении несросшихся переломов и ложных суставов большеберцовой кости / Д.В. Павлов, А.Е. Новиков // Травматология и ортопедия России. – 2009. – № 2. – С. 106–111.

7. Полиморфизм гена трансформирующего фактора роста бета 1 при постменопаузальном остеопорозе / М.Ю. Крылов [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2009. – № 1. – С. 18–23.

8. Полиморфизм гена TGFβ1 (Arg25Pro) и гена EGF (A2073T) у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае / А.М. Миromanov, К.А. Гусев, С.А. Усков // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – Ч. 7. – С. 1360–1364.

9. Полиморфизм гена TNF-α (G-308A) у больных с гнойно-воспалительными осложнениями при переломах длинных костей конечностей в Забайкальском крае [Электронный ресурс] / А.М. Миromanov и [др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 1. – С. 41–45. – Режим доступа: <http://chitgma.ru/zmv2>.

10. Analysis of common transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms in gastric and duodenal ulcer disease: Pilot study / A.V. Polonikov [et al.] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 22. – P. 555–564.

11. Annes J.P. Making sense of latent TGF-beta activation // J.P. Annes, J.S. Munger, D.B. Rifkin // J. Cell. Sci. – 2003. – Vol. 116. – P. 217–224.

12. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene with prevalent vertebral fractures in Japanese women / Y. Yamada [et al.] // Am J. Med. – 2000. – Vol. 109. – P. 244–247.

13. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor-beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins / R.W. Keen [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2001. – Vol. 40. – P. 48–54.

14. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene : association with transforming growth factor beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation / M.R. Award [et al.] // Transplantation. – 1998. – № 66. – P. 1014–1020.

15. Transforming Growth Factor –β1 to the bone / K. Janssens [et al.] // Endocrine Reviews. – 2005. – Vol. 26. – P. 743–774.

References

1. Geneticheskij polimorfizm citokinov / Cygan V.N [i dr.] // Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii. 2010. no. 2. pp. 211–219.

2. Ketlinskij S.A. Citokiny / S.A. Ketlinskij, A.S. Simbircev. SPb.: Foliant, 2008. 552 p.

3. Malenkaja molekula i bolshaja bolezn / A.S. Rudoi i [dr.] // Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii. 2009. no. 3(27). pp. 166–172.

4. Miromanov A.M. Prognosticheskie kriterii razvitiya oslozhnenij pri perelomah kostej konechnostej / A.M. Miromanov, E.V. Namokonov. Chita: RIC ChGMA, 2014. 175 p.

5. Ocenka znachimosti polimorfizmov genov LRP5, BMP4, TGFβ1 pri postmenopauzalnom osteoporoze / V.A. Mjakotkin

- [i dr.]// Nauchno-prakticheskaja revmatologija. 2008. no. 3. pp. 8–15.
6. Pavlov D.V. Intramedulljarnyj osteosintez pri lechenii nesrossihhsja perelomov i lozhnyh sustavov bolshebercovoj kosti / D.V. Pavlov, A.E. Novikov // Travmatologija i ortopedija Rossii. 2009. no. 2. pp. 106–111.
7. Polimorfizm gena transformirujushhego faktora rosta beta 1 pri postmenopauzalnom osteoporozе / M.Ju. Krylov [i dr.]// Nauchno-prakticheskaja revmatologija. 2009. no. 1. pp. 18–23.
8. Polimorfizm gena TGFβ1 (Arg25Pro) i gena EGF (A2073T) u bolnyh s narusheniem konsolidacii perelomov v Zabajkalskom krae / A.M. Miromanov, K.A. Gusev, S.A. Uskov // Fundamentalnye issledovanija. 2014. no. 10. Ch. 7. pp. 1360–1364.
9. Polimorfizm gena TNF-α (G-308A) u bolnyh s gnojno-vospalitelnyimi oslozhnenijami pri perelomah dlinnyh kostej konechnostej v Zabajkalskom krae [Jelektronnyj resurs] / A.M. Miromanov i [dr.]// Zabajkalskij medicinskij vestnik. 2013. no. 1. pp. 41–45. Rezhim dostupa: <http://chitgma.ru/zmv2>.
10. Analysis of common transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms in gastric and duodenal ulcer disease : Pilot study / A.V. Polonikov [et al.]// J. Gastroenterol. Hepatol. 2007. Vol. 22. pp. 555–564.
11. Annes J.P. Making sense of latent TGF-beta activation // J.P. Annes, J.S. Munger, D.B. Rifkin // J. Cell. Sci. 2003. Vol. 116. pp. 217–224.
12. Assotiation of a polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene with plevalent vertebrale fractures in Japanese women / Y. Yamada [et al.]// Am J. Med. 2000. Vol. 109. pp. 244–247.
13. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor-beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins / R.W. Keen [et al.]// Rheumatology (Oxford). 2001. Vol. 40. pp. 48–54.
14. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene : assotiation with transforming growth factor beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation / M.R. Award [et al.]// Transplantation. 1998. no. 66. pp. 1014–1020.
15. Transforming Growth Factor – β1 to the bone / K. Janssens [et al.]// Endocrine Reviews. 2005. Vol. 26. pp. 743–774.

Рецензенты:

Лобанов С.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии с курсом урологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита;

Цыбиков Н.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита.