

РОЛЬ ИЛ-6 В РАЗВИТИИ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ ДЕФОРМАЦИИ ПОЗВОНОЧНИКА У ДЕТЕЙ С ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

Филиппова А.Н., Виссарионов С.В., Баиндурашвили А.Г., Хальчицкий С.Е., Согоян М.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г.И. Турнера» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: info@roturner.ru

Идиопатический сколиоз является мультифакторным заболеванием, в структуре этой патологии одно из ведущих значений занимает генетический фактор. Изучение генетических ассоциаций является одним из основных подходов в оценке формирования и прогрессирования деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом в процессе роста ребенка. Одной из гипотез развития деформации является дегенерация межпозвонковых дисков на вершине деформации с утверждением «дегенерация-воспаление». Дегенерация межпозвонковых дисков является частью очень сложного каскада реакций, изначально вызванных повышением уровня и активности воспалительных цитокинов, например интерлейкина-6 (ИЛ-6). Проведено клиническое и молекулярно-генетическое обследование 113 детей с идиопатическим сколиозом и 157 детей, не имеющих деформацию позвоночника. Для определения генетической предрасположенности использовали показатель отношения шансов, а также построение трех моделей наследования: мультипликативной, общей и аддитивной. Ни в одной модели не было найдено взаимосвязи полиморфизма гена ИЛ-6-174 (G/C) с развитием и прогрессированием деформации при идиопатическом сколиозе. Полученные результаты свидетельствуют лишь о том, что при мультифакторных заболеваниях могут существовать различные генетически пенетрантные варианты, которые, в частности, могут встречаться одновременно у пациентов с идиопатическим сколиозом, взаимодействуя и увеличивая или уменьшая вероятность развития деформации позвоночника.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, развитие и прогрессирование деформации, ДНК, полиморфизм гена ИЛ-6, модели наследования

THE ROLE OF IL-6 IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF SPINAL DEFORMITY IN CHILDREN WITH IDIOPATHIC SCOLIOSIS

Filippova A.N., Vissarionov S.V., Baindurashvili A.G., Khalchitskiy S.E., Sogoyan M.V.

«NIDOI im. G.I. Turner» of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, e-mail: info@roturner.ru

Idiopathic scoliosis is a multifactorial disease, and one of the leading roles is played by the genetic factor. The study of genetic associations is one of the main approaches in the study of predisposition to the development and progression of deformation in idiopathic scoliosis. One of the hypotheses for the development of deformation is the degeneration of the intervertebral discs at the top of the deformation with the statement "degeneration-inflammation". Degeneration of intervertebral discs is part of a very complex cascade of reactions initially caused by increased levels and activity of inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6). Clinical and molecular genetic examination of 113 children with idiopathic scoliosis and 157 children without spinal deformity was carried out. The odds ratio indicator was used to determine genetic predisposition, and three inheritance models were constructed: multiplicative, General, and additive. In no model was found the relationship of IL-6-174 (G/C) gene polymorphism with the development and progression of deformation in idiopathic scoliosis. The results suggest only that in multifactorial diseases, there may be different genetically penetrant variants, which, in particular, may occur simultaneously in patients with idiopathic scoliosis, interacting and increasing or decreasing the likelihood of spinal deformity.

Keywords: idiopathic scoliosis, development and progression of deformation, DNA, IL-6 gene polymorphism, inheritance models

Этиология и патогенез развития идиопатического сколиоза являются одним из наиболее актуальных вопросов, изучаемых на протяжении многих лет. В последнее время ученые приходят к мнению, что идиопатический сколиоз является мультифакторным

заболеванием, в котором наибольшую роль отдают таким факторам, как диспропорциональный костный рост, остеопения, дефицит мелатонина, дисфункция мелатонин-сигнальной системы [1, 2]. Хотя точные патогенетические механизмы до конца не изучены, во многих этих процессах одно из ведущих значений отдают генетическим нарушениям, мутациям и полиморфизмам генов. Прогресс в молекулярной биологии дал возможности для широких геномных исследований, идентификации локусов, связанных с какой-либо патологией, выявления генетических полиморфизмов, предрасполагающих или модифицирующих риск развития многофакторных заболеваний. Изучение генетических ассоциаций является одним из основных подходов в исследовании формирования и предрасположенности к прогрессирующему характеру течения деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом в процессе их роста. Однако этот подход может привести к выявлению ложных генетических ассоциаций. С учетом этого важными принципами данной методики исследования являются репликация ассоциаций в различных популяциях и проведение исследования с большим размером выборки [3–5].

Одной из гипотез формирования и развития деформации позвоночника является дегенерация межпозвонковых дисков на вершине деформации с утверждением «дегенерация-воспаление». В настоящее время хорошо известно, что дегенерация межпозвонковых дисков является частью очень сложного каскада реакций, изначально вызванных повышением уровня и активности воспалительных цитокинов. Они увеличивают экспрессию ферментов матричной дегенерации по типу металлопротеиназы. Повышение функциональной активности этих ферментов способствует распаду агреканов, в том числе протеогликанов внеклеточного матрикса, являющихся основой пульпозного ядра и фиброзного кольца межпозвоночного диска. Помимо протеогликанов, эти ферменты активируют расщепление фибриллярных белков внеклеточной матрицы межпозвоночного диска. Кроме этих катаболических процессов, цитокины влияют на клеточный метаболизм.

Во-первых, они подавляют процессы матричного ремоделирования. Во-вторых, цитокины усиливают процессы внутриклеточного катаболизма, что значительно снижает функциональную стабильность межпозвоночных дисков. В-третьих, цитокины способствуют клеточному апоптозу. Возникающий дисбаланс между процессами катаболизма и анаболизма приводит к дегенеративным процессам в межпозвоночных дисках [6, 7]. Интерлейкин-6 (IL-6) является провоспалительным и противовоспалительным цитокином, участвует в регенеративных процессах, в активации иммунной системы, в регуляции метаболизма, в поддержании костного гомеостаза и во многих нервных функциях. Полиморфизм G/C промоторной области гена IL-6 влияет на функциональную активность белка Ил-6. Трансфекция аллеля IL-6-174C в HeLa клетки *in vitro* привела к снижению

продукции IL-6 по сравнению с аллелем IL-6-174G [8–10].

Aulisa et al. в 2007 г. были первыми, кто исследовал роль функционального полиморфизма IL-6 в патогенезе идиопатического сколиоза. В их исследование вошли 53 ребенка с идиопатическим сколиозом и 206 детей контрольной группы. В результате проведенной работы выявлено превышение в 2 раза патологического гена у пациентов с идиопатическим сколиозом по сравнению с детьми из контрольной группы [11]. В 2010 г. ученые из Китая Zhen Liu et al. исследовали полиморфизм IL-6 в своей популяции: в исследование вошли 487 детей с идиопатическим сколиозом и 494 здоровых ребенка, в результате ученые не нашли связи развития деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом с полиморфизмом гена IL-6 [12]. В 2015 г. этот же полиморфизм исследовали болгарские ученые S. Nikolova с соавт. на своей популяционной выборке. В исследование были включены 80 пациентов с идиопатическим сколиозом и 160 здоровых детей. Они так же, как и итальянские ученые, получили результаты, где наличие патологического аллеля в группе детей с идиопатическим сколиозом было значительно выше, чем в контрольной группе (70% против 30%) [13]. В 2017 г. ученые Sui W. et al. из Китая вновь исследовали связь полиморфизма гена IL-6 в ассоциации с геном MMP-3 с развитием и прогрессированием идиопатического сколиоза. Существенной разницы между контрольной группой и группой детей с идиопатическим сколиозом обнаружено не было [14].

Как уже говорилось, все генетические теории должны проверяться на нескольких популяциях (минимум на двух) с разным количеством случаев в каждой выборке. Учитывая этот факт, нами было проведено данное исследование.

Целью данной работы явилась проверка гипотезы взаимосвязи полиморфизма гена IL-6-174 (G/C) с формированием и прогрессированием деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе в европеоидной популяции.

Материал и методы исследования

В период с 2016 по 2018 гг. нами были обследованы 113 детей с прогрессирующим течением идиопатического сколиоза в возрасте от 14 до 18 лет с законченным костным ростом, тест Риссера 4–5 баллов. В контрольную группу вошли 157 детей 14–18 лет, у которых на момент осмотра не выявлено признаков деформации позвоночника и другой ортопедической патологии. Всем обследуемым было проведено клиническое и молекулярно-генетическое обследование. Подавляющее большинство детей с идиопатическим сколиозом были девочки – 93 человека, мальчиков – 20 человек. В контрольную группу, наоборот, были включены в основном лица мужского пола – 109 человек, женского пола – 48 человек.

Всем детям с идиопатическим сколиозом было проведено стандартное

рентгенологическое исследование в объеме: рентгенограммы в двух стандартных проекциях – прямая и боковая, компьютерная томография грудного и поясничного отделов позвоночника по программе «сколиоза». Величина деформации по данным рентгенологических исследований у всех пациентов составляла от 45° до 137°, в среднем 79°. Кроме этого, у всех пациентов была взята периферическая кровь на молекулярно-генетический анализ. Из лейкоцитов периферической крови выделяли ДНК стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ генетических полиморфизмов осуществляли наборами реагентов «SNP-Скрин» для определения однонуклеотидных полиморфизмов ДНК методом ПЦР в режиме реального времени на анализаторе CFX96 Touch™ Real-Time PCR DetectionSystem (Bio-Rad, USA). Генотипирование проводили по однонуклеотидному полиморфизму гена *IL-6* -174 (G/C).

Статистическая обработка данных произведена с помощью онлайн-калькуляторов медицинской статистики. Использовали равновесие Харди–Вайнберга для оценки соответствия распределения генотипов по изученному полиморфизму и критерий χ^2 Пирсона для сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов по тому же полиморфизму в группах пациентов с идиопатическим сколиозом, а также в группе здоровых детей. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Большая часть современных исследований генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям проводится с использованием подхода «случай – контроль». Задачей исследований является поиск аллелей генов, частоты которых значимо различаются в группах пациентов и здоровых индивидов. Для определения генетической предрасположенности при таком многофакторном заболевании, как идиопатический сколиоз, использовали показатель отношения шансов (OR – odds ratio). Значение данного показателя представляет собой отношение шансов события в одной группе к шансам события в другой группе, или во сколько раз вероятность оказаться в группе «случай» (больные) отличается от вероятности оказаться в группе «контроль» (здоровые) для носителя определенного генотипа (аллеля) по изученному полиморфизму. $OR = (A/B)/(C/D)$, где A и B – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный аллель, соответственно; а C и D – количество здоровых, имеющих и не имеющих мутантный генотип или аллель, соответственно. По OR можно судить о наличии связи данного генотипа с риском развития заболевания. $OR = 1$ свидетельствует об отсутствии связи данного генотипа с риском развития заболевания; $OR > 1$ означает повышенный риск развития заболевания; $OR < 1$ – отрицательная ассоциация ДНК-маркёра с развитием патологии. Для OR рассчитывался доверительный интервал (CI) при 95%-ном уровне значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение аллелей и генотипов по исследуемому полиморфизму гена *IL-6*-174

(G/C) в контрольной группе и группе детей с идиопатическим сколиозом представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов в контрольной группе и в группе детей с идиопатическим сколиозом

IL-6 (-174 G / C)	Контроль (n=157)	%	Идиопатический сколиоз (n=113)	%
Аллель G	124		148	
Аллель C	190		78	
G/G	35	22	45	40
G/C	54	34,5	58	51
C/C	68	43,5	10	9

Исходя из полученных данных можно отметить, что патологический генотип C/C в контрольной группе (группе здоровых детей) встречается почти в 5 раз чаще, чем в группе детей с идиопатическим сколиозом: 43,5% против 9%. Появление аллеля C в контрольной группе составляет 190 раз в отличие от группы детей с деформацией позвоночника – 78.

Распределение частот генотипов в выборке детей, не имеющих деформацию позвоночника (в контрольной группе), а также в группе детей с идиопатическим сколиозом соответствует равновесию Харди–Вайнберга (табл. 2, 3)

Таблица 2

Тест Харди–Вайнберга (HWE) для контролей (тест хи-квадрат, df = 1*)

Генотипы	Контроль	HWE	χ^2	p
	n=157			
Генотип G/G	0,223	0,156	12,34	0,0004
Генотип G/C	0,344	0,478		
Генотип C/C	0,433	0,366		

Таблица 3

Тест Харди–Вайнберга для случаев (тест хи-квадрат, df = 1*)

Генотипы	ИС	HWE	χ^2	p
	n=113			

Генотип G/G	0,398	0,429	2,07	0,15
Генотип G/C	0,513	0,452		
Генотип C/C	0,088	0,119		

*Примечание. d. f. – число степеней свободы

Для описания многофакторного заболевания, такого как идиопатический сколиоз, мы использовали три модели наследования: мультипликативную, общую и аддитивную (табл. 4, 5, 6). Мультипликативная модель строилась на предположении, что пенетрантность гена *IL-6-174* (G/C) зависит от количества копий предполагаемого аллеля риска – аллель С.

Таблица 4

Мультипликативная модель наследования (тест хи-квадрат, df = 1)

Аллели	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
	n=113	n=157			Знач.	95%-ный CI
Аллель G	0,655	0,395	35,53	3.0E-9	2,91	2,04–4,15
Аллель С	0,345	0,605			0,34	0,24–0,49

Таким образом, можно сказать, что отношение шансов для носителей аллеля С составило 0,34 (95%-ный CI 0,24–0,49), что говорит об отрицательной ассоциации ДНК-маркёра *IL-6* с развитием и прогрессированием деформации у детей с идиопатическим сколиозом. Общая модель наследования показывает распределение встречаемости каждого генотипа в группах контроля и детей с идиопатическим сколиозом.

Таблица 5

Общая модель наследования (тест хи-квадрат, df = 2)

Генотипы	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
	n=113	n=157			Знач.	95%-ный CI
Генотип G/G	0,398	0,223	38,37	5.0E-9	2,31	1,35–3,93
Генотип G/C	0,513	0,344			2,01	1,23–3,30
Генотип C/C	0,088	0,433			0,13	0,06–0,26

В таблице 5 видно, что патологический генотип C/C не связан с развитием деформации позвоночника в исследуемой группе детей с идиопатическим сколиозом, отношение шансов для генотипа C/C составляет 0,13 (95%-ный CI 0,06–0,26). По аддитивной модели наследования можно предположить, что значение пенетрантности гетерозигот

исследуемого гена *IL-6-174* (G/C) лежит между значениями пенетрантности для обеих гомозигот.

Таблица 6

Аддитивная модель наследования (тест Кохрана–Армитаджа для линейных трендов, $\chi^2 = [0,1,2], df = 1$)

Генотипы	Случай	Контроль	χ^2	p	OR	
	n=113	n=157			Знач.	95%-ный CI
Генотип G/G	0,398	0,223	30,36	4.0E-8	2,31	1,35–3,93
Генотип G/C	0,513	0,344			2,01	1,23–3,30
Генотип C/C	0,088	0,433			0,13	0,06–0,26

В аддитивной модели также значение OR для генотипа C/C составляет 0,13 (95%-ный CI 0,06-0,26), что меньше единицы, а следовательно, дает нам право говорить, что и при этой модели наследования патологический аллель не является маркёром развития деформации при идиопатическом сколиозе.

Заключение

Таким образом, в проведенном нами исследовании не было найдено взаимосвязи полиморфизма гена *IL-6-174* (G/C) с формированием и прогрессированием деформации позвоночника у пациентов с идиопатическим сколиозом в европеоидной популяции. Эти данные соответствуют результатам, полученным учеными из Китая (Zhen Liu et al. [12], Sui W. [14]), хотя, судя по проведенным ранее исследованиям, в итальянской и болгарской популяциях эти результаты иные [11, 13]. Полученные результаты свидетельствуют лишь о том, что при мультифакторных заболеваниях могут существовать различные генетически пенетрантные варианты, которые, в частности, встречаются одновременно у пациентов с идиопатическим сколиозом, взаимодействуя и увеличивая или уменьшая вероятность развития деформации позвоночника. В дополнение к генетическим факторам могут оказывать влияние факторы окружающей среды, которые влияют на пациентов, предрасположенных к идиопатическому сколиозу, но не имеют влияния в контрольной группе. Кроме того, люди, не страдающие сколиозом и попавшие в контрольную группу, но имеющие тем не менее предрасположенность к заболеванию, могут просто не подвергаться в своей жизни воздействию тех факторов окружающей среды, которые способствуют формированию сколиоза.

Список литературы

1. Siu King Cheung C., Tak Keung Lee W., Kit Tse Y., Ping Tang S., Man Lee K., Guo X., Qin L., Chun Yiu Cheng J. Abnormal peripubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003. Vol. 28. P. 2152-2157.
2. Azeddine B., Letellier K., Wang D.S., Moldovan F., Moreau A. Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2007. Vol. 462. P. 45-52.
3. Neale B.M., Sham P.C. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet.* 2004. Vol. 75. P. 353-362.
4. Ward K., Ogilvie J.W., Singleton M.V., Chettier R., Engler G., Nelson L.M., Validation of DNA-based prognostic testing to 250 predict spinal curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010. Vol. 35 (25). E1455-1464.
5. Sharma S., Gao X., Londono D., Devroy S.E., Mauldin K.N., Frankel J.T., Brandon J.M., Zhang D., Li Q.Z., Dobbs M.B., Gurnett C.A., Grant S.F., Hakonarson H., Dormans J.P, Herring J.A., Gordon D., Wise C.A. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. P. 1456-1466.
6. Risbud M.V., Shapiro I.M. "Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014. Vol. 10 (1). P. 44-56. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.160.
7. Eskola P.J., Kjaer P., Daavittila I.M., Solovieva S., Okuloff A., Sorensen J.S., Wedderkopp N., Ala-Kokko L., Männikkö M., Karppinen J.I. Genetic risk factors of disc degeneration among 12-14-year-old Danish children: A population study. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2010. Vol. 1. P. 158-165.
8. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S., "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6," *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011. Vol. 1813 (5). P. 878-888.
9. Morocz M., Czibula A., Grozer Z. B., Szécsényi A., Almos P.Z., Raskó I., Illés T. Association study of BMP4, IL6, Leptin, MMP3, and MTNR1B gene promoter polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 2011. Vol. 36 (2). P. 123-130.
10. Lee J.S., Suh K.T., Eun I.S. Polymorphism in interleukin-6 gene is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *The Journal of Bone & Joint*

Surgery Series B. 2010. Vol. 92 (8). P. 1118-1122.

11. Aulisa L., Papaleo P., Pola E. Angelini F., Aulisa A.G., Tamburrelli F.C., Pola P., Logroscino C.A. "Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study," *Spine*. 2007. Vol. 32 (24). P. 2700-2702.
12. Liu Z., Tang N. L. S., Cao X.B. Liu W.J., Qiu X.S., Cheng J.C., Qiu Y. Lack of association between the promoter polymorphisms of MMP-3 and IL-6 genes and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study in a Chinese Han population. *Spine*. 2010. Vol. 35 (18). P. 1701-1705.
13. Nikolova S., Dikova M., Dikov D., Djerov A., Dzhebir G., Atanasov V., Savov A., Kremensky I. Role of the IL-6 gene in the etiopathogenesis of idiopathic scoliosis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2015. P. 621893. DOI: 10.1155/2015/621893.
14. Sui W., Yang J., Huang Z., Wang Q., Fan H., Deng Y. Polymorphisms in promoter regions of MMP-3 and IL-6 genes are not associated to adolescent idiopathic scoliosis (AIS) gender bias. *J. Back Musculoskelet Rehabil*. 2017. Vol. 30 (3). P. 559-563. DOI: 10.3233/BMR-150309.