

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА БЕТА-1 (TGFB1) И РАЗВИТИЕ ДЕФОРМАЦИИ ПОЗВОНОЧНИКА У ДЕТЕЙ С ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение «НМИЦ детской травматологии и ортопедии имени Г.И. Турнера» Минздрава России, Пушкин, e-mail: info@roturner.ru

Идиопатический сколиоз является одним из наиболее часто встречающихся заболеваний опорно-двигательного аппарата среди пациентов детского возраста. Несмотря на то что заболевание до настоящего времени считается идиопатическим, одной из вероятных причин развития данной патологии считают генетическую природу. Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFB1) – полифункциональный цитокин, экспрессия которого связана с физиологическими процессами роста, дифференцировки, регенерации и стрессовой реакцией во многих типах клеток организма. В периоды активного морфогенеза в соединительных тканях наблюдаются высокие уровни транскриптов и/или белков, одним из них является TGFB1 – фактор их роста и дифференцировки. 111 пациентам с прогрессирующим течением идиопатического сколиоза в возрасте от 14 до 18 лет и 123 детям контрольной группы проведено клиническое и молекулярно-генетическое обследование. В проведенном исследовании было установлено, что связь между развитием деформации позвоночника у пациентов с идиопатическим сколиозом и наличием неблагоприятных полиморфных вариантов гена TGFB1 C509T является статистически слабой, но при разделении исследуемых групп пациентов на подгруппы по фенотипическим признакам шанс найти общий фактор риска увеличивается.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, развитие и прогрессирование деформации, полиморфизм гена TGFB1, отношения шансов, фенотипическая гетерогенность.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 (TGFB1) AND THE DEVELOPMENT OF SPINE DEFORMATION IN CHILDREN WITH IDIOPATHIC SCOLIOOSIS

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

H. Turner National Medical Research Center for Children's Orthopedics and Trauma Surgery, Pushkin, e-mail: info@roturner.ru

Idiopathic scoliosis is one of the most common diseases of the musculoskeletal system among pediatric patients. Despite the fact that the disease is still considered idiopathic, one of the likely causes of the development of this pathology is considered to be genetic in nature. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) is a polyfunctional cytokine whose expression is associated with the physiological processes of growth, differentiation, regeneration, and stress response in many types of body cells. During periods of active morphogenesis, high levels of transcripts and/or proteins are observed in connective tissues, one of them is TGFB1, a factor of their growth and differentiation. 111 patients with progressive course of idiopathic scoliosis aged 14 to 18 years and 123 children of the control group underwent clinical and molecular genetic examination. In the study, it was found that the relationship between the development of spinal deformity in patients with idiopathic scoliosis and the presence of unfavorable polymorphic variants of the TGFB1 C509T gene is statistically weak, but when the study groups of patients are divided into subgroups according to phenotypic characteristics, the chance to find a common risk factor increases.

Keywords: idiopathic scoliosis, deformity development and progression, TGFB1 gene polymorphism, odds ratios, phenotypic heterogeneity.

Идиопатический сколиоз является одним из наиболее часто встречающихся заболеваний опорно-двигательного аппарата среди пациентов детского возраста, частота встречаемости составляет 2–3%. Несмотря на то что заболевание до настоящего времени считается идиопатическим, одной из вероятных причин развития данной патологии полагают генетическую природу, что доказывают проводимые sibлинговые и семейные генетические исследования [1]. Генетические мутации являются основной причиной моногенных

заболеваний и редких синдромов, в то время как функциональные генетические полиморфизмы часто могут быть связаны с этиопатогенезом многофакторных заболеваний, к каким относят идиопатический сколиоз [2, 3]. Ведущим подходом к идентификации генетических вариантов, связанных с полиморфными заболеваниями, остаются исследования ассоциаций генов-кандидатов и полногеномных ассоциаций «случай – контроль» (так называемые ассоциативные исследования). Трансформирующий фактор роста бета-1 (TGFB1) – полифункциональный цитокин, экспрессия которого связана с физиологическими процессами роста, дифференцировки, регенерации и стрессовой реакцией во многих типах клеток организма [4]. Дикинсон и другие [5] сообщили о высоких уровнях транскриптов и/или белков в соединительных тканях в периоды активного морфогенеза, предполагая, что TGFB1 является важным фактором их роста и дифференцировки. Результаты одного из исследований [6] у пациентов с идиопатическим сколиозом азиатского происхождения показали заметное увеличение уровня экспрессии TGFB1 в апикальных суставных отростках вогнутой стороны деформации позвоночника по сравнению с выпуклой стороной искривления. Этот феномен предполагает участие TGFB1 в качестве этиологического или вторичного фактора в развитии деформации позвоночника. При этом в исследовании экспрессии TGFB1 у 9 пациентов с идиопатическим сколиозом европейского происхождения не было обнаружено различий между выпуклой и вогнутой сторонами деформации позвоночного столба [7]. В другом исследовании ассоциации генов-кандидатов частоты генотипа и аллеля TGFB1 (-509C/T) сравнивали между пациентами с идиопатическим сколиозом и контрольной группой в популяции восточноевропейского происхождения. В общей группе полиморфный аллель T и гомозиготный генотип TT были связаны с большей частотой идиопатического сколиоза и могут рассматриваться как аллель риска и генотип риска соответственно в болгарской популяции ($RR > 1,5$) [8]. Ученые из Китая пришли в своем исследовании к выводу, что в китайской популяции ген TGFB1 может не быть геном предрасположенности к идиопатическому сколиозу, тем не менее он может играть роль в прогрессировании искривления при идиопатическом сколиозе [9]. Рыжков и другие [10] в своем исследовании оценивали предрасположенность к развитию деформации позвоночника идиопатического характера и генетические полиморфизмы C-509T (rs1800469) и Arg25Pro (rs1800471) гена TGFB1 в российской популяции. В исследование были включены 300 пациентов с идиопатическим сколиозом и 300 здоровых подростков того же возраста и пола из Центральной России. Аллель -509T и генотип -509TT гена TGFB1 были достоверно связаны с повышенным риском идиопатического сколиоза как у женщин, так и у мужчин. Регрессионный анализ выявил рецессивную модель генетической ассоциации между полиморфизмом C-509T гена TGFB1 и идиопатическим сколиозом.

Любое генетическое исследование проверяется минимум на двух популяциях, при этом учитывается количество случаев в каждой выборке пациентов (том числе в контрольной группе). Таким образом, целью данной работы было исследовать ассоциацию полиморфизма гена трансформирующего фактора роста бета-1 (TGFB1) C509T с деформацией позвоночника при идиопатическом сколиозе у детей в российской популяции.

Материалы и методы исследования

В период с 2018 по 2020 гг. нами обследованы 111 детей с прогрессирующим течением идиопатического сколиоза в возрасте от 14 до 18 лет. В контрольную группу вошли 123 подростка 16–18 лет, которые не имели ортопедической патологии, в том числе деформации позвоночника. В обследуемой группе пациентов из 111 детей были 91 девочка и 20 мальчиков, что соответствует статистическому распределению среди подростков с идиопатическим сколиозом. Группа контроля, наоборот, была представлена больше лицами мужского пола: из 123 подростков 48 девочек и 75 мальчиков. Всем детям с идиопатическим сколиозом проведено клиническое и молекулярно-генетическое обследование. В группе контроля детям была взята периферическая кровь на молекулярно-генетический анализ.

В исследуемой группе детям выполняли рентгенографию грудного и поясничного отделов позвоночника в прямой и боковой проекции. Исследуемую группу составили пациенты с идиопатическим сколиозом в основном 4-й степени – 79 детей, и 32 ребенка с 3-й степенью, угол сколиотической деформации по Cobb варьировал от 51 градуса до 138 градусов. Большая часть пациентов имели деформацию грудной локализации (57 детей), у 32 пациентов была выявлена поясничная и грудопоясничная деформация позвоночника, и 22 пациента имели S-образный идиопатический сколиоз.

В качестве биологического материала для генетического исследования полиморфных вариантов гена TGFB1 использовали периферическую кровь. Для выделения ДНК осуществляли забор крови в объеме 3 мл из локтевой вены. После выделения ДНК из периферической крови детей исследуемой и контрольной групп проводили генотипирование образцов ДНК по распространенному полиморфизму гена TGFB1 C509T (rs1800469). Анализ генетических полиморфизмов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени (Real-time ПЦР) на анализаторе CFX96 Touch™ Real-Time PCR DetectionSystem (Bio-Rad, USA) с помощью коммерческих наборов реагентов «SNP-Скрин» (Синтол, Россия) для определения однонуклеотидных полиморфизмов ДНК. Для метода Real-time ПЦР характерны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Детектировали продукты Real-time ПЦР на двух каналах флуоресценции (Fam и Hex). Интерпретировали результаты по графикам интенсивности сигнала флуоресценции по кинетическим кривым амплификации в автоматическом режиме.

Статистическая обработка данных произведена с помощью онлайн-калькуляторов медицинской статистики (<https://medstatistic.ru/calculators>, <https://wpcalc-com.translate.goog>).

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение аллелей и генотипов по исследуемому полиморфизму гена TGFB1-509 (C/T) в контрольной группе и группе детей с идиопатическим сколиозом представлено в таблице 1.

Таблица 1

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

TGFB1 C509T	Контроль (n=123)	%	Идиопатический сколиоз (n=111)	%
Аллель С	162	65,8	145	65,3
Аллель Т	84	34,2	77	34,7
C/C	52	42,3	44	39,6
C/T	58	47,2	57	51,4
T/T	13	10,5	10	9

Как показано в таблице 1, шанс появления неблагоприятного аллеля как в группе детей с идиопатическим сколиозом, так и в контрольной группе исследования сравнительно одинаков – 34,7% и 34,2% соответственно. При этом патологический генотип T/T (монозиготный генотип по двум неблагоприятным аллелям) в группе контроля встречается практически с такой же частотой, как в основной группе: в 10,5% случаев, тогда как у детей с идиопатическим сколиозом – в 9% наблюдений.

Для проверки нормальности распределения генотипов мы использовали тест Харди–Вайнберга отдельно для основной группы и для группы контроля (табл. 2, 3)

Таблица 2

Тест Харди–Вайнберга (HWE) для детей с идиопатическим сколиозом (тест хи-квадрат, df=1)

Генотипы	ИС	HWE	D*	χ^2
	n=111			
Генотип G/G	44	47,3536	-0,07	1,9742
Генотип G/C	57	50,2928	+0,13	
Генотип C/C	10	13,3536	-0,25	

Примечание. *D – относительное отклонение ожидаемого результата

Таблица 3

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

Генотипы	Контроль	HWE	D*	χ^2
	n=123			
Генотип G/G	52	53,3415		0,2893
Генотип G/C	58	55,3171		
Генотип C/C	13	14,3415		

Примечание. *D – относительное отклонение ожидаемого результата

Согласно данным, представленным в таблице 2, ожидаемое значение частот генотипов отличается от действительного, в том числе частота ожидаемого патологического генотипа выше, чем действительного, что отражено в большем отклонении критерия χ^2 , что говорит о меньшей вероятности появления патологического генотипа в основной группе. В таблице 3 отклонения ожидаемых значений частот генотипов в группе контроля не имеют большого отличия от действительного, значение критерия χ^2 имеет небольшое отклонение от 0, следовательно, соответствует равновесию Харди–Вайнберга. При этом в обеих таблицах критерий χ^2 ниже критического при заданных степенях свободы (df=1).

Для определения предрасположенности к развитию и прогрессированию деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом, согласно современным исследованиям в области генетики, мы использовали показатель отношения шансов (OR – odds ratio). Для полиморфизма гена TGFB1 C509T показатель OR>1 (1,024), что говорит о положительной ассоциации ДНК-маркера с развитием и прогрессированием деформации при идиопатическом сколиозе.

Таблица 4

Показатель отношения шансов по полиморфизму гена TGFB1 C509T

Шанс найти фактор риска в основной группе	0,531
Шанс найти фактор риска в контрольной группе	0,519
Отношение шансов (OR)	1,024
Стандартная ошибка отношения шансов (S)	0,195
Нижняя граница 95% ДИ (CI)	0,699
Верхняя граница 95% ДИ (CI)	1,500

Для оценки статистически значимой силы связи между фактором риска и развитием патологии, то есть наличием неблагоприятного аллеля Т, развитием и прогрессированием деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе, полученные нами данные были обработаны с помощью онлайн-калькуляторов статистики по имеющимся критериям силы связи (табл. 5).

Критерии оценки силы связи между фактором риска и исходом

Наименование критерия	Значение критерия	Сила связи*
Критерий ϕ Критерий V Крамера Критерий K Чупрова**	0,122	слабая
Коэффициент сопряженности Пирсона (C)	0,121	слабая
Нормированное значение коэффициента Пирсона (C')	0,171	слабая

* – интерпретация полученных значений статистических критериев согласно рекомендациям Rea&Parker

** – для четырехпольной таблицы, используемой в данном калькуляторе, все три критерия (ϕ , Крамера, Чупрова) принимают одно и то же значение

Таким образом, в проведенном исследовании на выбранной группе пациентов мы определили достоверно значимую связь полиморфизма гена TGFB1 C509T с развитием и прогрессированием деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом. При этом статистическая обработка данных указывает на слабую взаимосвязь между признаками.

Согласно литературным данным, многие ученые причину «неудач» в поиске генов-кандидатов, отвечающих за развитие и прогрессирование деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе, видят в фенотипической гетерогенности выборки пациентов. Мы разделили общую группу пациентов с идиопатическим сколиозом на подгруппы согласно варианту сколиотической деформации позвоночника: S-образный сколиоз был выявлен у 14 детей (12,6%), грудной тип искривления – у 61 ребенка (55%), поясничный – у 36 (32,4%) пациентов. В таблице 6 представлено распределение генотипов в подгруппах детей с идиопатическим сколиозом согласно варианту деформации.

Таблица 6

Распределение генотипов и аллелей гена TGFB1 C509T согласно виду сколиоза

Вид сколиоза	TGFB1 C509T					
	C/C	C/T	T/T	Аллель C	Аллель T	Всего
S-образный	5	9	0	19	9	14
Грудной	19	42	10	80	62	61
Поясничный	12	19	5	43	29	36

Как видно из таблицы 6, патологический генотип TT был выявлен в 16% случаев в группе детей с грудным типом идиопатического сколиоза и в 14% случаев – в группе детей с поясничным сколиозом. В группе детей с S-образным искривлением позвоночного столба патологический генотип TT не встречался, при этом отмечено, что гетерозиготный генотип СТ, содержащий неблагоприятный аллель T, встречался в 64% наблюдений.

Для определения предрасположенности к развитию деформации позвоночника того или иного вида мы провели статистическую обработку полученных данных для каждого варианта деформации отдельно по показателю отношения шансов (OR). У пациентов с S-образным сколиозом по полиморфизму гена TGFB1 C509T показатель $OR=0,914$ (95%CI 0,396–2,107, $p<0,05$), что говорит об отрицательной связи между неблагоприятным аллелем T и развитием S-образной деформации позвоночника у детей с идиопатическим сколиозом. Развитие грудного варианта идиопатического сколиоза имело положительную ассоциативную связь с наличием неблагоприятных аллелей T в гене TGFB1 у пациентов с данным видом деформации, показатель $OR=1,495$ (95%CI 0,979–2,283, $p<0,05$). Кроме того, было выявлено, что при поясничном и грудопоясничном варианте идиопатического сколиоза связь между наличием неблагоприятных аллелей T и развитием деформации была положительна и статистически значима, $OR=1,301$ (95%CI 0,758–2,231, $p<0,05$).

Заключение

Таким образом, в проведенном нами исследовании было установлено, что связь между развитием деформации позвоночника у пациентов с идиопатическим сколиозом и наличием неблагоприятных полиморфных вариантов гена TGFB1 C509T является статистически слабой. Полученные результаты не противоречат данным других авторов [7, 8], в том числе российских коллег [10]. При этом, опираясь на теорию фенотипической гетерогенности мультифакторных заболеваний [11], каким является идиопатический сколиоз, мы выявили новые данные о выраженности полиморфизмов при различных видах деформации позвоночника. Так, наличие неблагоприятных аллелей по полиморфизму гена TGFB1 у пациентов с S-образным, грудным и поясничным/грудопоясничным идиопатическим сколиозом не всегда имеет связь с фенотипическим проявлением деформации позвоночника, что было доказано при статистической обработке данных в каждой подгруппе пациентов отдельно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при мультифакторных заболеваниях при разделении исследуемых групп пациентов на подгруппы по различным фенотипическим признакам шанс найти общий фактор риска увеличивается.

Список литературы

1. Tang N.L., Yeung H.Y., Hung V.W., Di Liao C, Lam T.P., Yeung H.M., Lee K.M., Ng B.K., Cheng J.C. Genetic epidemiology and heritability of AIS: A study of 415 Chinese female patients. *J. Orthop Res.* 2012. Vol. 30 (9). P. 1464-1469. DOI: 10.1002/jor.22090.
2. Negrini S., De Mauroy J.C., Grivas T.B. et al. Actual evidence in the medical approach to adolescents with idiopathic scoliosis. *Eur. J. Phys. Rehabil. Med.* 2014. Vol. 50. P. 87-92.

3. Yang T., Jia Q., Guo H., Xu J., Bai Y., Yang K., Luo F., Zhang Z., Hou T. Epidemiological survey of idiopathic scoliosis and sequence alignment analysis of multiple candidate genes. *Int Orthop*. 2012. Vol. 36 (6). P. 1307-1314. DOI: 10.1007/s00264-011-1419-z.
4. Santibañez J.F., Quintanilla M., Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2011. Vol. 121 (6). P. 233-251. DOI: 10.1042/CS20110086.
5. Dickinson M.E., Kobrin M.S., Silan C.M. et al. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF- β superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics*. 1990. Vol. 6 (3). P. 505-520. DOI: 10.1016/0888-7543(90)90480-I.
6. Qiu G., Li Q., Liu Y. et al. Expression of transforming growth factor- β 1 and basic fibroblast growth factor in articular process cartilages of adolescent idiopathic scoliosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006. Vol. 86 (21). P. 1478-1483.
7. Nowak R., Kwiecien M., Tkacz M., Mazurek U. Transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling in paravertebral muscles in juvenile and adolescent idiopathic scoliosis. *BioMed Research International*. 2014. P. 14. DOI: 10.1155/2014/594287.594287.
8. Nikolova S., Dikova M., Dikov D. et al. Positive Association between TGFB1 Gene and Susceptibility to Idiopathic Scoliosis in Bulgarian Population. *Analytical Cellular Pathology (Amst)*. 2018. P. 6836092. DOI: 10.1155/2018/6836092.
9. Xu L., Sun W., Qin X., Qiu Y., Zhu Z. The TGFB1 gene is associated with curve severity but not with the development of adolescent idiopathic scoliosis: a replication study in the Chinese population. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016. Vol. 17 (1, art. 15). DOI: 10.1186/s12891-016-0863-8.
10. Ryzhkov I.I., Borzilov E.E., Churnosov M.I., Ataman A.V., Dedkov A.A., Polonikov A.V. Transforming growth factor beta 1 is a novel susceptibility gene for adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013. Vol. 38 (12). P. E699-704. DOI:10.1097/BRS.0b013e31828de9e1.
11. Gorman K.F., Julien C., Moreau A. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2012. Vol. 21 (10). P. 1905-1919. DOI: 10.1007/s00586-012-2389-6.